



**UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS
TOURS**

Ecole Doctorale : Santé, Sciences, Technologie

Année Universitaire : 2003-2004

**THESE POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE TOURS**

Discipline : Sciences de la Vie

Présentée et soutenue publiquement par

Sébastien DUGRAVOT

le 26 mars 2004

**LES COMPOSES SECONDAIRES SOUFRES DES *ALLIUM* :
ROLE DANS LES SYSTEMES DE DEFENSE DU POIREAU ET ACTIONS SUR LA BIOLOGIE DES
INSECTES**

Directeur de thèse : Eric THIBOUT

JURY :

Anne-Geneviève BAGNERES	Directeur de Recherche	- CNRS – Tours	Examineur
Marie-France CORIO-COSTET	Directeur de Recherche	- INRA – Bordeaux	Examineur
Anne-Marie CORTESERO	Maître de Conférences HDR	- Université de Rennes 1	Rapporteur
Martine HOSSAERT-McKEY	Directeur de Recherche	- CNRS – Montpellier	Rapporteur
Bruno LAPIED	Professeur	- Université d'Angers	Examineur
Jacques PASTEELS	Professeur	- Université libre de Bruxelles	Examineur
Eric THIBOUT	Directeur de Recherche	- CNRS – Tours	Directeur de Thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier très chaleureusement « Mesdames les rapporteurs » de ce travail, Madame Martine Hossaert-McKey qui a bien voulu juger le manuscrit malgré son absence le jour de la soutenance et Madame Anne-Marie Cortesero qui a accepté la fonction de rapporteur avec enthousiasme bien qu'elle attende un heureux évènement très prochainement.

Je souhaite également adresser mes sincères remerciements à Mesdames et Messieurs les membres du Jury pour avoir accepté d'effectuer un déplacement plus ou moins long pour assister à la soutenance, Madame Marie-France Corio-Costet, Madame Anne-Geneviève Bagnères, Monsieur le professeur Jacques Pasteels, et Monsieur le professeur Bruno Lapied.

Je remercie bien évidemment les personnes qui ont participé activement à l'élaboration de ce travail :

Eric Thibout, mon directeur de thèse, pour avoir toujours réussi à se rendre disponible quand j'avais besoin de lui, pour les précieuses corrections apportées à ce manuscrit, mais également pour sa bonne humeur quotidienne et sa gentillesse.

Jacques Huignard, pour la confiance qu'il m'a accordé quand j'étais étudiant en Maîtrise, pour sa participation active lors de la première partie de ce manuscrit et lors de la rédaction des différentes publications. Je lui souhaite de tout cœur une bonne retraite bien méritée.

Bruno Lapied et toute son équipe, pour cette très belle collaboration sur l'étude du mode d'action du DMDS. Je n'oublierais jamais son enthousiasme communicatif lors des expériences d'électrophysio. Mes deux séjours à Angers resteront de très bons moments de ma thèse.

Nathalie Mondy, notamment pour les expériences d'analyses chimiques mais surtout pour les nombreuses discussions constructives que nous avons eues ensemble.

Jacques Auger, pour sa connaissance de la chimie des *Allium* et pour ses confidences sur l'état d'avancement de l'utilisation éventuelle des composés soufrés en fumigation.

Dominique Pierre et Jean-Claude Biémont pour m'avoir orienté sur la piste des précurseurs soufrés et de l'acide jasmonique.

Nicole Mandon et Ingrid Arnault, pour leur participation lors des analyses en HPLC.

Jérôme Casas, notre Big-Boss (Directeur de l'IRBI, UMR CNRS 6035), grâce à qui j'ai pu partir à Neuchâtel et au Danemark.

Christine Besse, notre secrétaire, pour sa gestion de la logistique administrative.

Et de nombreuses autres personnes du labo avec qui j'ai pu partager des instants sympathiques.

Enfin, je ne vais pas manquer de remercier les personnes qui ont participé à leur façon à l'élaboration de ce travail :

Ma petite femme Dali, pour m'avoir soutenu et souvent remonté le moral et pour ne s'être jamais lassée d'écouter mes histoires de poireaux pendant ces quelques années, mais également pour ne pas avoir hésité à se salir les mains le week-end en m'aidant à faire les élevages de teigne ou d'*Agrotis*.

Le jeune Docteur Fauconnier alias T.O, pour ses mails quotidiens, son soutien sans faille et sa motivation contagieuse pour la science depuis notre rencontre sur les bancs de la Fac., 8 ans et demi, déjà !! il s'en est passé des choses !!!

Mes fidèles compagnons du labo, MagicFab et Nono, pour les pauses quotidiennes décontractantes. Allez Nono c'est bientôt fini !!! Je n'oublie pas non plus, l'ex-Irbien, Mister O. parti faire sa thèse au soleil.

Les 3 (futurs)docteurs (ex)tourangeaux, Bim, Momo et Coupi, pour leur amour de la bonne table et les discussions souvent passionnées.

Mes nombreux amis pour la vie, qui malgré leur éloignement, sont toujours présents (Suffiette, Gagui, Tonton, Rouquinou l'homme aux 1000 surnoms, DD, Bui, Tin).

Pour finir, je voudrais remercier ma famille, ma Mère, mon Père, mon Frère, Mélina, ma Grand-Mère, mes deux Grand-Pères à qui je dédicace ce manuscrit et qui m'ont inculqué l'amour des Sciences Naturelles, ma tante Ginette pour les corrections des fautes d'orthographe...

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE

Evolution des relations plantes-phytophages : historique et scénario co-évolutif

Effets des composés secondaires sur les organismes et implications dans les systèmes de défense

Spécialisation et stratégies de résistance développées par les insectes face aux composés secondaires

Systèmes de défense directe et indirecte induite par l'attaque des phytophages

Spécificité de la réponse des plantes

Mécanismes biochimiques des systèmes de défense induite

Applications potentielles de l'étude des relations plantes-insectes

Présentation du modèle d'étude

- La plante : *Allium porrum*
- Le phytophage *A. assectella* et le parasitoïde *Diadromus pulchellus*

Objectifs de l'étude

1^{ère} Partie :

TOXICITE ET MODE D'ACTION DES COMPOSES SECONDAIRES DES *ALLIUM* ET STRATEGIES DE RESISTANCE DEVELOPPEES PAR LES INSECTES

Introduction à la 1^{ère} partie

CHAPITRE 1 : Toxicité des substances soufrées des *Allium* sur les insectes

1.1/ Introduction

1.2/ Matériels et Méthodes

a) Matériel biologique

a₁) Insectes des denrées stockées : *C. maculatus* et son parasitoïde *D. basalis*

a₂) Insecte urbain : *P. americana*

a₃) Lépidoptères phytophages inféodés aux plantes productrices de composés secondaires soufrés: *A. assectella* et *P. xylostella*

a₄) Lépidoptère phytophage polyphage : *A. ipsilon*

b) Méthodes expérimentales

b₁) Description de la substance testée

b₂) Mise au point du dispositif expérimental

- b₃) Tests de toxicité sur les adultes d'insectes
- b₄) Tests de toxicité sur les chenilles de lépidoptères
- c) Paramètres estimés

1.3/ Résultats

- a) Tests de toxicité sur les insectes des denrées stockées
- b) Tests de toxicité sur *P. americana*
- c) Tests de toxicité sur les lépidoptères spécialistes des plantes productrices de composés soufrés
- d) Tests de toxicité sur le lépidoptère généraliste

1.4/ Discussion

CHAPITRE 2 : Mode d'action des substances soufrées des *Allium* sur les insectes

2.1/ Introduction

2.2/ Matériels et Méthodes

- a) Susceptibility of adult mice to DMDS
- b) Electrophysiology
 - b₁) Synaptic transmission – single fiber oil-gap recordings
 - b₂) Isolated DUM neurons - Whole cell patch-clamp recordings
- c) Effects of DMDS on cellular respiration
 - c₁) *Drosophila melanogaster* S2 cell line
 - c₂) Isolated plant mitochondria

2.3/ Results

- a) Susceptibility of adult mice to DMDS
- b) Effects of DMDS on the cockroach CNS
 - b₁) Effects of DMDS on isolated axon
 - b₂) Effects of DMDS on synaptic transmission
 - b₃) Effets of DMDS on the electrophysiological properties of DUM neurones
- c) Effects of DMDS on cellular respiration
 - c₁) Effect of DMDS on *D. melanogaster* S2 cells
 - c₂) Effects of DMDS on plant mitochondria

2.4/ Discussion

CHAPITRE 3 : Mécanismes de résistance développés par des insectes confrontés aux composés soufrés des *Allium*

3.1/ Introduction

3.2/ Matériels et Méthodes

- a) Matériel biologique
- b) Méthodes expérimentales

- b₁) Analyse de la mortalité des adultes de *C. maculatus* après deux expositions au DMDS
- b₂) Analyse de l'activité glutathion S-transférase des insectes
- c) Analyse des données

3.3/ Résultats

- a) Sensibilité des adultes après une ou deux expositions au DMDS
- b) Analyse de l'activité enzymatique glutathion S-transferase

3.4/ Discussion

Conclusion de la 1^{ère} partie

2^{ème} Partie :

REPONSE DU POIREAU INDUITE PAR L'ATTAQUE D'UN PHYTOPHAGE ET CONSEQUENCES SUR LES INSECTES SATELLITES

CHAPITRE 4 : Réponse du poireau induite par l'attaque des larves d'*A. assectella*

4.1/ Introduction

4.2/ Matériels et Méthodes

- a) Matériel biologique
 - a₁) Le poireau
 - a₂) Les phytophages
- b) Méthodes expérimentales
 - b₁) Protocole d'attaque
 - b₂) Méthode d'analyse de la concentration des précurseurs des substances volatiles soufrées
 - b₃) Dosage de l'acide jasmonique endogène
 - b₄) Méthode d'analyse des composés volatils émis par les poireaux
- c) Analyses statistiques

4.3/ Résultats

- a) Analyse de la concentration en précurseurs soufrés
 - a₁) Effets des attaques
 - a₂) Effets de l'intensité des attaques
 - a₃) Effets d'un stress provoqué par une blessure mécanique
 - a₄) Effets de l'intervalle de temps entre l'attaque et l'analyse
 - a₅) Etude de la « systémicité »
 - a₆) Spécificité de la réponse du poireau
 - a₇) Effets de l'acide jasmonique
 - a₈) Effets des attaques sur la concentration en acide aspartique et acide glutamique
- b) Analyse de l'émission des composés volatils
 - b₁) Analyse qualitative

b₂) Analyse quantitative

4.4/ Discussion

CHAPITRE 5 : Conséquences de la réponse induite chez le poireau sur les insectes satellites

5.1/ Introduction

5.2/ Matériels et Méthodes

a) Matériel biologique

a₁) Le poireau

a₂) Le lépidoptère phytophage

a₃) L'hyménoptère parasitoïde

b) Méthodes expérimentales

b₁) Etude du comportement alimentaire et du comportement de ponte chez *A. assectella*

b₂) Etude du développement chez *A. assectella*

b₃) Etude du comportement de recherche de l'hôte par *D. pulchellus*

c) Analyses statistiques

5.3/ Résultats

a) Influence de la réponse induite chez le poireau sur le comportement alimentaire d'*A. assectella*

b) Influence de la réponse induite chez le poireau sur le comportement de ponte d'*A. assectella*

c) Influence de la réponse induite chez le poireau sur le développement d'*A. assectella*

d) Influence de la réponse induite chez le poireau sur le comportement de recherche de l'hôte par *D. pulchellus*

5.4/ Discussion

DISCUSSION GENERALE

Les composés secondaires soufrés constitutifs des Allium : un système de défense efficace contre les insectes généralistes...

...mais pas contre les insectes spécialistes !!

Comment minimiser les dégâts occasionnés par un insecte spécialiste ??

- par une action directe sur la fitness du phytophage
- en attirant l'ennemi naturel du phytophage
- par une stratégie de tolérance des attaques modérées

En conclusion

BIBLIOGRAPHIE

LISTE DES FIGURES & TABLEAUX

- Fig. 1** : Attraction des parasitoïdes par les odeurs émises par des feuilles de maïs
- Fig. 2** : Rôle de l'acide jasmonique dans les réactions de défense induites des plantes
- Fig. 3** : Coupe longitudinale de poireau
- Fig. 4a** : Biosynthèse des précurseurs (alk(en)yl cystéine sulfoxides) des substances volatiles soufrées chez les *Allium*
- Fig. 4b** : Biosynthèse des substances volatiles soufrées à partir des alk(en)yl cystéine sulfoxides chez les *Allium*
- Fig. 5a** : Œufs d'*A. assectella*
- Fig. 5b** : Larve d'*A. assectella*
- Fig. 5c** : Cocon d'*A. assectella*
- Fig. 5d** : Adulte d'*A. assectella*
- Fig. 6** : Femelle de *D. pulchellus* sur nymphe d'*A. assectella*
- Fig. 7** : Femelle de *C. maculatus* sur graine de niébé
- Fig. 8** : Femelle de *D. basalis* sur graine de niébé
- Fig. 9** : Adulte de *P. americana*
- Fig. 10a** : Adulte d'*A. assectella*
- Fig. 10b** : Larve d'*A. assectella*
- Fig. 11a** : Adulte de *P. xylostella*
- Fig. 11b** : Larve de *P. xylostella*
- Fig. 12** : Larve d'*A. ipsilon*
- Fig. 13** : Schéma du dispositif expérimental utilisé pour les tests de toxicité
- Fig. 14** : Taux de mortalité des adultes de *C. maculatus* et de *D. basalis*
- Fig. 15** : Taux de mortalité des adultes de *P. americana*
- Fig. 16** : Taux de mortalité des adultes d'*A. assectella*
- Fig. 17** : Taux de mortalité des adultes de *P. xylostella*
- Fig. 18** : Taux de mortalité des larves d'*A. assectella*
- Fig. 19** : Taux de mortalité des larves de *P. xylostella*
- Fig. 20** : Taux de mortalité des larves d'*A. ipsilon*
- Fig. 21** : Corps cellulaire de DUM neurone isolé
- Fig. 22** : Taux de mortalité de la souris, *M. musculus*
- Fig. 23** : Effet du DMDS sur la transmission synaptique
- Fig. 24** : Effet du DMDS sur les propriétés électrophysiologiques d'un DUM neurone
- Fig. 25** : Activation des canaux K_{ATP} des DUM neurones
- Fig. 26** : Effet du DMDS sur la respiration cellulaire
- Fig. 27** : Effet du DMDS sur l'oxydation de différents substrats mitochondriaux
- Fig. 28** : Effet du DMDS sur le complexe IV
- Fig. 29** : Représentation schématique du transfert d'électrons dans les mitochondries végétales et de l'effet de l'inhibition du complexe IV sur les DUM neurones
- Fig. 30** : Représentation schématique du protocole utilisé pour la détermination de l'activité GST chez les insectes
- Fig. 31** : Activité GST des adultes de *C. maculatus* préalablement exposés ou non au DMDS
- Fig. 32** : Représentation schématique du protocole de préparation des extraits de poireau pour le dosage des précurseurs soufrés
- Fig. 33** : Analyse de la concentration en PCSO sur un même extrait dérivé deux fois
- Fig. 34** : Dispositif expérimental utilisé pour le piégeage des odeurs en SPME
- Fig. 35** : Exemple d'un spectre chromatographique des composés volatils émis par le poireau et détectés en mode SIR

Fig. 36 : Concentration moyenne (\pm SE) en PCSO chez des poireaux sains et chez des poireaux attaqués naturellement en champ

Fig. 37 : Concentration moyenne (\pm SE) en PCSO chez des poireaux de 6 mois sains ou attaqués par 15 larves d'*A. assectella* pendant 8 jours

Fig. 38 : Concentration moyenne (\pm SE) en PCSO chez des poireaux de 6 mois sains ou attaqués par 5 larves d'*A. assectella* pendant 8 jours ou par 15 larves pendant 3 jours

Fig. 39 : Concentration moyenne (\pm SE) en PCSO chez des poireaux de 2 mois sains ou attaqués par 3 larves d'*A. assectella* pendant 8 jours

Fig. 40 : Concentration moyenne (\pm SE) en PCSO chez des poireaux de 6 mois sains ou blessés mécaniquement quotidiennement pendant 8 jours

Fig. 41 : Concentration moyenne (\pm SE) en PCSO chez des poireaux de 2 mois sains ou attaqués par 3 larves d'*A. assectella* pendant 3 jours avec ou sans délais après la fin de l'attaque

Fig. 42 : Concentration moyenne (\pm SE) en PCSO chez des poireaux de 6 mois sains ou attaqués par 15 larves d'*A. assectella* pendant 8 jours, avec ou sans délais après la fin de l'attaque

Fig. 43 : Concentration moyenne (\pm SE) en PCSO chez des poireaux de 6 mois dans les feuilles vertes de poireaux sains, dans les feuilles vertes attaquées ou dans les feuilles vertes saines de poireaux attaqués

Fig. 44 : Concentration moyenne (\pm SE) en PCSO chez des poireaux de 6 mois sains ou attaqués par 5 larves d'*A. ipsilon* pendant 8 jours

Fig. 45 : Concentration en jasmonate de méthyle chez des poireaux de 6 mois sains ou attaqués par 15 larves d'*A. assectella* pendant 8 jours

Fig. 46 : Concentration moyenne (\pm SE) en PCSO chez des poireaux de 6 mois sains ou traités quotidiennement par 10 mM d'acide jasmonique pendant 8 jours

Fig. 47 : Concentration moyenne (\pm SE) en acide glutamique et en acide aspartique chez des poireaux de 6 mois sains ou attaqués par 15 larves d'*A. assectella* pendant 8 jours

Fig. 48 : Profil chromatographique d'un poireau brisé mécaniquement et d'un poireau attaqué par des larves d'*A. assectella*

Fig. 49 : Moyenne (\pm SE) de la quantité de disulfures de dipropyle, de disulfures de propyle propényle et de l'ensemble des disulfures émis par un poireau de 6 mois sain ou préalablement attaqué par 15 larves d'*A. assectella* pendant 8 jours

Fig. 50 : Analyse en composantes principales de la composition du spectre de substances volatiles soufrées potentiellement émis par un poireau sain et par un poireau attaqué par 15 larves d'*A. assectella* pendant 8 jours

Fig. 51 : Femelle de *D. pulchellus* s'apprêtant à parasiter une chrysalide d'*A. assectella*

Fig. 52a : Schéma du dispositif expérimental utilisé pour l'étude du comportement alimentaire et du comportement de ponte chez *A. assectella* en enceinte close

Fig. 52b : Dispositif expérimental utilisé pour l'étude du comportement alimentaire et du comportement de ponte d'*A. assectella* en enceinte close

Fig. 53 : Description schématique du tunnel de vol utilisé pour l'étude du comportement de ponte d'*A. assectella* et pour l'étude du comportement de recherche de l'hôte par *D. pulchellus*

Fig. 54a : Moyenne (\pm SE) de la longueur de la mine traduisant la quantité de végétal consommé par les larves d'*A. assectella* sur un poireau sain ou sur un poireau préalablement attaqué par 15 larves pendant 8 jours

Fig. 54b : Nombre de larves d'*A. assectella* ayant consommé plus de surface végétale sur l'un ou l'autre poireau

Fig. 55a : Moyenne (\pm SE) du nombre d'œufs pondus par femelle d'*A. assectella* sur un poireau sain ou sur un poireau préalablement attaqué par 15 larves pendant 8 jours, en enceinte close

Fig. 55b : Nombre de femelles de *A. assectella* ayant pondu plus d'œufs sur l'un ou l'autre poireau

Fig. 56 : Moyenne (\pm SE) du nombre d'œufs pondus par femelle d'*A. assectella* sur un poireau sain ou sur un poireau attaqué par 5 larves pendant 8 jours en tunnel de vol

Fig. 57 : Moyenne (\pm SE) du nombre d'œufs pondus par femelle d'*A. assectella* sur un poireau sain ou sur un poireau attaqué par 15 larves pendant 8 jours en tunnel de vol

Fig. 58 : Moyenne (\pm SE) du poids des chrysalides d'*A. assectella* mâles et femelles dans leur cocon s'étant développées sur poireau sain ou sur poireau préalablement attaqué par 15 larves pendant 8 jours

Fig. 59 : Moyenne (\pm SE) de la durée de développement d'individus mâles et femelles d'*A. assectella* issus d'un poireau sain ou d'un poireau préalablement attaqué par 15 larves pendant 8 jours b

Fig. 60 : Pourcentage de mortalité des larves d'*A. assectella* se développant sur un poireau sain ou sur un poireau préalablement attaqué par 15 larves pendant 8 jours

Fig. 61 : Moyenne (\pm SE) du nombre d'ovocytes chorionnés dans les ovarioles de femelles d'*A. assectella* issues d'un poireau sain ou d'un poireau préalablement attaqué par 15 larves pendant 8 jours

Fig. 62 : Nombre de femelles de *D. pulchellus* ayant choisi le poireau sain ou le poireau attaqué par 15 larves d'*A. assectella* pendant 8 jours

Fig. 63 : Nombre de femelles de *D. pulchellus* ayant choisi le poireau sain ou le poireau sain + fèces
99b

Fig. 64 : Nombre de femelle ayant choisi le poireau sain coupé ou le poireau coupé et préalablement attaqué mais lavé de toutes traces de fèces

Tableau 1 : Comparaison des CL₅₀

Tableau 2 : Mortalité des adultes de *C. maculatus* après une ou deux expositions au DMDS pendant 24h

Tableau 3 : Composition des éluants (méthode Pico-tag Waters)

Tableau 4 : Programme d'enregistrement en mode SIR (Selected Ion recorded).

ABREVIATIONS UTILISEES POUR LES SUBSTANCES

SOUFREES DES *ALLIUM*

- Les acides aminés soufrés précurseurs (alk(en)ylcystéine sulfoxides)
 - ACSO : Allyl cystéine sulfoxide
 - MCSO : Méthyl cystéine sulfoxide
 - PCSO : Propyl cystéine sulfoxide
 - PeCSO : Propenyl cystéine sulfoxide

- Les substances soufrées volatiles (disulfures, thiosulfates, zwiebelanes)
 - DPDS : Disulfure de dipropyle
 - DMDS : Disulfure de diméthyle
 - PPeDS : Disulfure de propyle propenyle
 - DMTi : Thiosulfate de diméthyle
 - DPTi : Thiosulfate de dipropyle
 - MPTi : Thiosulfate de méthyle propyle
 - MPeTi : Thiosulfate de méthyle propenyle
 - PeMTi : Thiosulfate de propenyle méthyle
 - PMTi : Thiosulfate de propyle méthyle
 - PPeTi : Thiosulfate de propyle propenyle
 - Z cis & trans : Cis-Zwiebelane et Trans-Zwiebelane

INTRODUCTION GENERALE

Les végétaux, du fait de leur incapacité à se mouvoir sont soumis dans leur environnement à une multitude de stress biotiques ou abiotiques. En effet, ils ne peuvent échapper aux différentes attaques d'espèces phytophages ou d'organismes pathogènes, ni même aux aléas climatiques. Ainsi, les stress biotiques peuvent être engendrés par un grand nombre d'espèces vivantes appartenant à divers taxons d'herbivores : mammifères, reptiles, amphibiens, mollusques, oiseaux, arthropodes (Karban et Baldwin, 1997) ou de pathogènes : virus, mycoplasmes, bactéries, champignons, nématodes, protozoaires (Staskawicz et al., 1995). Toutefois, lorsque l'on estime l'importance relative des herbivores par rapport à la quantité de matières végétales qu'ils consomment, les insectes sont les plus voraces des espèces phytophages (van der Meijden, 1996). Chaque année, ils consomment en moyenne 10% de la production végétale dans les systèmes naturels et sont responsables de 15% des pertes de récoltes dans le monde (Schultz, 2002). Ainsi pour subsister dans l'environnement, les plantes ont donc dû mettre en place au cours de l'évolution différentes stratégies leur permettant de réduire ou de minimiser les dégâts occasionnés par leurs ennemis naturels et en particulier par les insectes phytophages. Des mécanismes très importants qui ne seront pas détaillés dans cette introduction ont également été mis en place chez les plantes lors de phénomènes de résistance vis-à-vis de stress abiotiques (stress thermiques, hydriques, ultraviolets...) ou vis-à-vis de stress biotiques engendrés par des pathogènes.

Evolution des relations plantes-phytophages : historique et scénario co-évolutif

Selon la théorie co-évolutive classique énoncée par Ehrlich et Raven en 1964, les organismes phytophages, notamment les insectes, en consommant les différentes parties d'une plante influencent la croissance ou la reproduction du végétal et exercent ainsi de fortes pressions de sélection sur celui-ci. En réponse à ces pressions, des génotypes existant dans la population végétale, possédant des caractères permettant aux plantes d'être moins consommées par les phytophages, se seraient alors transmis aux générations futures, favorisés par la sélection naturelle. De même, chez les phytophages, les gènes codant pour des mécanismes permettant à l'individu de se

développer aux dépens de tels végétaux auraient été à leur tour sélectionnés. Ainsi, la sélection réciproque entre les plantes et les insectes phytophages aurait agit pendant plusieurs millions d'années comme un véritable moteur évolutif conduisant à la diversification des espèces d'insectes et des espèces végétales. La moitié des espèces vivantes décrites appartient à la classe des insectes (1 million d'espèces connues dont 400 000 sont des insectes phytophages (Schultz, 2002)) ou au règne végétal (240 000 espèces connues) (Futuyama, 2000). Ehrlich et Raven (1964) affirment même que l'influence des insectes phytophages sur les végétaux serait en partie responsable de la formidable biodiversité terrestre.

Les plantes, pour lutter contre les espèces phytophages, auraient donc, selon cette théorie, développé au cours de l'évolution, des batteries de défenses de natures diverses. Ces défenses peuvent être physiques notamment par l'élaboration de structures perturbant la prise alimentaire par les phytophages. Ainsi, les épines, les poils urticants ou la présence d'épais téguments sont fréquemment rencontrés chez un grand nombre de familles végétales. Ces défenses de nature physiques et en particulier les épines sont surtout efficaces vis-à-vis des phytophages de grandes tailles tels que les vertébrés mais n'ont apparemment qu'une efficacité limitée vis-à-vis de phytophages de taille plus restreintes tels que les insectes (Karban et Baldwin, 1997). En revanche, les défenses de natures chimiques vont avoir de nombreux effets sur l'ensemble des phytophages quelles que soient leurs tailles.

Depuis de nombreuses années, la mise en évidence, l'établissement et le maintien de ces défenses chimiques et physiques dans les populations végétales par la sélection naturelle, sont le sujet d'un grand nombre d'études et de débats. Sachs, un des pionniers de la physiologie végétale, a le premier rapporté l'existence de composés chimiques produits par les plantes et n'ayant aucun rôle apparent dans le métabolisme de base des végétaux (1873 ; cité par Hartmann, 1996). Errera (1886 ; 1904, cité par Hartmann, 1996) et Stahl (1888 ; cité par Rausher, 1992) ont ensuite proposé l'hypothèse que ces composés pouvaient avoir un rôle de défense pour les plantes qui les produisaient. Finalement le rôle fonctionnel de ces composés, qualifiés de composés issus du métabolisme secondaire des plantes, fut ignoré jusqu'à ce que Fraenkel (1959) expose, dans un article très controversé et désormais célèbre, l'importance écologique ou « la raison d'être » du métabolisme secondaire des plantes dans les processus de défense contre les phytophages. L'idée que ces composés se sont

développés et ont été maintenus au cours de l'évolution en raison de leur rôle défensif chez les végétaux vis-à-vis des phytophages a été reprise par un certain nombre d'auteurs (Ehrlich et Raven, 1964 ; Janzen, 1969 ; Feeny, 1975 ; 1976 ; Rausher, 1981 ; Rhoades, 1983). Toutefois, d'autres biologistes ont contesté ce scénario co-évolutif au sens strict en prétendant que ces substances se sont développées dans les populations végétales car elles avaient d'autres rôles physiologiques (stockage de nutriment) et écologiques (protection vis-à-vis des UV), leurs fonctions défensives étant fortuites (Jermy 1976 ; Siegler, 1977 ; Swain, 1977). Les herbivores ne seraient pas présents en assez grand nombre pour imposer des pressions de sélection suffisantes sur les plantes pour aboutir à la production d'une telle diversité de composés secondaires (Jermy, 1976 ; 1984). Selon cet auteur, il se produirait plutôt un phénomène d'évolution séquentielle, où les insectes phytophages s'adaptent à la diversité structurale et chimique d'une espèce végétale et n'auraient pas d'influence notable sur l'évolution de celle-ci ; les relations entre les plantes et les insectes seraient alors asymétriques. Cependant un certain nombre de travaux ont montré que les herbivores pouvaient avoir des conséquences importantes sur la fitness des végétaux (Crawley, 1997 ; Hawkes et Sullivan, 2001) et ainsi provoquer la sélection de génotypes plus résistants.

Il semble donc certain que les caractères défensifs des plantes ont influencé l'évolution des insectes phytophages. En revanche, le fait que les insectes phytophages soient responsables de la mise en place des processus de défense chez les plantes est toujours sujet à controverse. Toutefois, de récentes expériences de terrain dans lesquelles les patterns de sélection des caractères défensifs des plantes ont été analysés en présence ou en absence d'ennemis naturels des végétaux, tendent à montrer que ces organismes peuvent potentiellement provoquer l'évolution des systèmes de défense des plantes (Rausher, 1996 ; Mauricio et Rausher, 1997 ; Schonle et Bergelson, 2000). Les relations entre les végétaux et l'ensemble de leurs ennemis naturels (co-évolution diffuse, Futuyama, 1983), provoqueraient donc une évolution réciproque des différents protagonistes s'effectuant par cycles (Rausher, 2001).

Effets des composés secondaires des plantes sur les organismes et implications dans les systèmes de défense

Malgré les nombreux débats concernant les causes de la généralisation et du maintien de ces substances dans les populations végétales, le rôle défensif de ces composés secondaires est désormais admis de tous. Les composés secondaires des plantes sont donc des substances allélochimiques susceptibles d'agir comme des systèmes de défenses constitutives directes, permettant aux plantes de réduire les dégâts occasionnés par leurs ennemis naturels. Les structures chimiques de certains composés secondaires de plantes particulièrement toxiques ont été isolées et des études ont été entreprises pour rechercher leurs mécanismes d'action sur les organismes. Nous allons voir à travers quelques exemples que le mode d'action des substances chimiques produites par les plantes peut s'exercer de manière très diverses sur les organismes qui y sont confrontés. Ainsi :

- les substances chimiques végétales peuvent agir sur le système nerveux des animaux. Par exemple, la nicotine, alcaloïde produit par les plantes du genre *Nicotiana*, est un analogue de l'acétylcholine et sa liaison sur les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine va provoquer des troubles irréversibles sur le système nerveux central des insectes (SNC). La toxicité de cette molécule s'exerce aussi sur les mammifères. Elle se lie également aux récepteurs postsynaptiques et provoque de ce fait une stimulation suivie de dépression des ganglions du système végétatif, des terminaisons des nerfs moteurs des muscles striés et du système nerveux central. La mort survient par paralysie des muscles respiratoires (Lauwerys, 1990).

- le mode d'action de ces composés végétaux peut s'exercer également sur le métabolisme des organismes. En effet, la roténone, composé secondaire extrait des plantes de la famille des papilionacées tel *Lonchocarpus nicou*, agit sur les mécanismes de la respiration cellulaire. Elle inhibe les oxydations cellulaires en interrompant le transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire, portant atteinte au métabolisme énergétique mitochondrial et ainsi à la production d'ATP (Weinzerl, 1998).

- des substances produites par certaines plantes vont pouvoir agir sur d'autres processus physiologiques plus spécifiques à leurs ennemis naturels. Ainsi, l'azadirachtine, isolée d'une plante de la famille des méliacées, le neem, *Azadirachta indica* va agir en tant qu'inhibiteur de croissance. Son action sur la synthèse

d'ecdystéroïdes par inhibition de l'hormone protothoracicotrope va bloquer la mue des insectes et interrompre ainsi leur cycle reproductif (Isman, 1997).

Tous les composés secondaires ne présentent pas un mode d'action aussi spectaculaire que ceux détaillés précédemment, mais il semble que la plupart d'entre eux puissent exercer des influences néfastes sur les consommateurs des plantes qui les produisent. Par exemple, les composés secondaires tels que certains alcaloïdes, les cardénolides, les terpènes ou les glucosinolates présents dans diverses familles de plantes, vont agir directement sur des paramètres liés à la fitness des phytophages tels que la croissance, le développement, la reproduction ou la longévité (Rosenthal et Berenbaum, 1991 ; Duffey et Stout, 1996). De même, les glycosides cyanogéniques produits par les plantes du genre *Trifolium* peuvent être considérés comme étant des caractères de défense de ces plantes car ils réduisent les dégâts engendrés par les cerfs, les limaces ou les escargots (Cooper-Driver et Swain, 1976 ; Dirzo et Harper, 1982). Enfin, d'une manière générale, la plupart des composés vont agir sur le comportement d'un grand nombre d'insectes phytophages par des processus de répulsion ou d'anti-appétence et vont ainsi pouvoir limiter les phénomènes de colonisation de ces plantes par les insectes (Bernays et Chapman, 1994).

Du fait de leurs actions sur la physiologie et/ou le comportement des ennemis naturels des plantes, les composés secondaires semblent donc avoir un rôle particulièrement important dans les processus de défense et permettent ainsi aux végétaux de minimiser d'une manière générale les dégâts occasionnés par leurs ennemis naturels tels que les insectes phytophages.

Spécialisation et stratégies de résistance développées par les insectes face aux composés secondaires

Il y a quelques années, près de 100 000 structures chimiques appartenant au métabolisme secondaire des plantes étaient identifiées, chaque espèce végétale ayant un assemblage unique de composés secondaires (Hartmann, 1996). Ces composés sont généralement très semblables au sein d'une même famille végétale mais leurs proportions peuvent différer selon les espèces. Ainsi, toutes les plantes appartenant au taxon des crucifères produisent des glucosinolates, mais les concentrations des

différentes classes de glucosinolates varient selon les espèces considérées. Cette incroyable diversité de structures chimiques rencontrées dans le règne végétal, potentiellement néfastes pour les insectes phytophages, a conduit à l'adaptation et la spécialisation alimentaire de ces derniers sur des plantes généralement proches phylogénétiquement les unes des autres, appartenant à une même famille, un même genre et possédant donc des composés secondaires de structures chimiques proches (Janzen, 1980). Ainsi, les espèces d'insectes spécialistes, monophages ou oligophages, sont très nombreuses, plus que les espèces généralistes ou polyphages (Strong et al., 1984). Selon Bernays et Graham (1988), moins de 10% des espèces d'insectes phytophages se nourrissent aux dépens de plus de 3 familles de plantes et plus de 80% se nourrissent sur une seule famille végétale (van Loon et al., 2000). Les plantes possédant des substances toxiques ou néfastes pour la plupart des herbivores peuvent ainsi être consommées par des espèces s'étant spécialisées. Par exemple, les plantes de la famille des rutacées produisent des composés secondaires, les furanocoumarines. Ces substances sont particulièrement toxiques vis-à-vis d'espèces de lépidoptères polyphages et vont notamment provoquer des taux de mortalité très importants chez *Spodoptera frugiperda* et chez *Heliothis virescens* lors de la consommation de ces végétaux (Berenbaum, 1978). En revanche, *Papilio polyxenes*, lépidoptère spécialiste des plantes appartenant à cette famille va pouvoir se développer aux dépens de ces végétaux sans mortalité particulière (Berenbaum, 1981).

Ces processus de spécialisation ont nécessité la mise en place chez les insectes de différents mécanismes adaptatifs leur permettant d'éviter les effets toxiques, répulsifs ou anti-appétants de ces composés. Au regard de la diversité des composés secondaires auxquels sont confrontés les insectes phytophages, il est bien évident que les différents mécanismes adaptatifs développés sont eux aussi très nombreux et font appels à différentes stratégies. Des adaptations ont pu ainsi être développées, permettant aux phytophages d'éviter l'interaction du composé toxique avec la cible située dans l'organisme consommateur (Berenbaum, 1986). Par exemple, le lépidoptère *Danaus plexippus* est capable d'éviter la toxicité de la ouabaïne, composé secondaire produit par les plantes du genre *Asclepias* grâce à la mutation d'un acide aminé sur le site de fixation de cette molécule, l'ATPase (Holzinger et al., 1992). La résistance peut également être comportementale, les phytophages minimisant alors l'exposition face au composé (Tallamy, 1986). Ainsi les chenilles de *Tricoplusia ni* se nourrissent entre les vaisseaux du panais (carotte sauvage, *Pastinaca sativa*), évitant alors le contact avec la furanocoumarine produite par la plante hôte (Zangerl et

Bazzaz, 1992). Enfin, le mode de résistance probablement le plus régulièrement rencontré chez les insectes phytophages est de nature biochimique, les molécules toxiques étant rendus inefficaces par des transformations enzymatiques nécessitant la mise en place de systèmes de détoxication (Krieger et al., 1971 ; Brattsten, 1992). C'est entre autres le cas des chenilles du lépidoptère *Manduca sexta* qui parviennent à détoxiquer la nicotine produite par leur plante hôte. Lors de l'ingestion des feuilles de tabac, la nicotine va provoquer l'activation de gènes codant pour la synthèse de cytochrome P450 permettant la détoxication et l'excrétion rapide de l'alcaloïde (Snyder et al., 1995 ; Snyder et Glendinning, 1996).

Par suite de l'évitement des effets néfastes des composés secondaires, la plupart des espèces d'insectes spécialistes ont été amenés à utiliser ces substances à leur profit notamment comme signaux informatifs pour la recherche et la reconnaissance de leur plante hôte dans l'environnement. Ainsi les glucosinolates et leurs composés de dégradation, les isothiocyanates produits par la famille des crucifères sont des composés secondaires toxiques vis-à-vis d'un très large spectre d'organismes (Chew, 1988 ; Louda et Mole, 1991). Pourtant, ces substances sont utilisées par les insectes spécialistes de cette famille tels les lépidoptères piéridés en tant que signaux pour la découverte de la plante hôte et comme stimulants du comportement de ponte et du comportement alimentaire (Slansky et Feeny, 1977 ; Louda et Mole, 1991 ; Renwick et al., 1992 ; Giamoustaris et Mithen, 1995 ; Renwick et Lopez, 1999).

Ces composés secondaires vont pouvoir être également utilisés par un certain nombre d'insectes spécialistes, par le biais de processus de séquestration, pour la protection vis-à-vis d'espèces entomophages (Duffey, 1980). Ainsi le coléoptère *Oreina cacaliae* se développe aux dépens de plantes de la famille des astéracées, produisant des alcaloïdes pyrrolizidiniques potentiellement toxiques. Ce phytophage, par la mise en place d'adaptations physiologiques, est capable de séquestrer ces composés secondaires dans l'hémolymphe ou dans des glandes exocrines, permettant la libération de sécrétions défensives lors de l'attaque d'un prédateur (Pasteels et al., 1988). De la même façon, le lépidoptère *Battus philenor* se nourrissant sur des plantes de la famille des aristolochiacées n'est que très rarement la proie d'hyménoptères parasitoïdes du fait de sa capacité à séquestrer les acides aristolochiques issus de sa plante hôte (Sime et al., 2000 ; Sime, 2002). Ces composés allélochimiques sont par ailleurs toxiques vis-à-vis d'autres organismes (Chen et Zhu, 1987).

Les plantes produisent donc de façon constitutive des composés secondaires leur permettant de se défendre directement contre certains herbivores et donc de restreindre le nombre d'espèces phytophages capables de se développer à leurs dépens. Cependant, comme cela vient d'être évoqué, ces systèmes de défense ne sont que partiellement efficaces vis-à-vis d'insectes spécialistes qui parviennent même à tirer profit de ces composés chimiques.

Systèmes de défense directe et indirecte induite par l'attaque des phytophages

En plus de cette production constitutive de composés ayant un rôle dans les processus de défense, les plantes ont été amenées au cours de l'évolution à répondre activement à l'attaque d'un phytophage. Des systèmes de défenses vont être ainsi induits par les herbivores et être mis en place au moment ou peu après le début de l'attaque. Green et Ryan (1972) ont les premiers mis en évidence ce phénomène en montrant que la consommation des feuilles de tomate, *Lycopersicon esculentum* ou de pomme de terre, *Solanum tuberosum*, par les larves du doryphore *Leptinotarsa decemlineata*, induit une rapide accumulation d'inhibiteurs de protéase dans la feuille de la plante. Ces protéines permettent de retarder la croissance des phytophages qui en ingurgitent (Johnson et al., 1989 ; Royo et al., 1999) et, de manière plus générale, d'améliorer la résistance de la plante vis-à-vis du ravageur (Hilder et al., 1987 ; Orozco-Cardenas et al., 1993).

Depuis, de nombreux auteurs ont montré que l'attaque d'insectes phytophages induit des changements biochimiques ou physiologiques chez les plantes ayant des conséquences négatives sur l'alimentation et le développement de ces herbivores et des conséquences positives sur la fitness de la plante (Agrawal, 1998 ; Baldwin, 1998). Ce système de résistance induite, démontré dans plus de 110 associations plantes-herbivores (Karban et Baldwin, 1997), a semble-t-il été maintenu par la sélection naturelle car il permet aux plantes de minimiser les coûts énergétiques liés aux défenses en l'absence de phytophages. Les ressources peuvent ainsi être allouées pour la croissance et la reproduction (Karban et Myers, 1989). Il semble désormais que les insectes phytophages ne déclenchant pas de réponse induite chez les plantes attaquées font figures d'exceptions (Schultz, 2002). Dans de nombreux cas, les composés impliqués dans ce système d'induction sont les mêmes que ceux déjà

présents de façon constitutive, mais leur concentration peut augmenter de façon très importante après l'attaque d'un insecte (Constabel, 1999). C'est entre autres le cas de la nicotine produite par les plants de tabac du genre *Nicotiana*. Cet alcaloïde toxique est présent dans les plants de tabac à des concentrations proches de 1% du poids sec d'une feuille. Lors de l'attaque par un herbivore, la concentration en nicotine dans les feuilles est de 4 à 10 fois supérieure aux concentrations retrouvées dans les feuilles de plants de tabac non attaqués (Baldwin, 1988a). Les concentrations atteintes sont alors suffisantes pour induire la mort d'un grand nombre de phytophages (Baldwin, 1988b).

L'induction des systèmes de défense est systémique chez de nombreux végétaux, c'est à dire que la production de substances défensives va augmenter non seulement au niveau du site d'attaque mais également dans toute la plante. Toutefois, l'intensité de l'augmentation des métabolites secondaires n'est pas toujours identique dans les différents tissus de la plante. En effet selon la théorie de l'« Optimal Defense » (McKey, 1979 ; Rhoades, 1979 ; Zangerl et Bazzaz, 1992), la concentration des composés secondaires est plus forte au niveau des parties importantes en terme de fitness pour la plante et au niveau des zones présentant de fortes probabilités d'attaques. Ainsi, chez le tabac, les concentrations de nicotine induite sont plus importantes au niveau du méristème floral et des jeunes feuilles qu'au niveau des vieilles feuilles (Ohnmeiss et Baldwin, 2000).

Face à ces défenses induites, des stratégies comportementales ou physiologiques ont pu être sélectionnées chez les insectes phytophages leur permettant de contourner partiellement ce type de défense. En restant sur le modèle tabac/insectes phytophages, deux exemples illustrent parfaitement ces adaptations :

- la salive produite par la filière des chenilles de *Helicoverpa zea*, comprend notamment de la glucose oxydase qui va, lors de la consommation de feuilles de tabac par ce phytophage, inhiber l'induction de nicotine chez la plante, et permettre ainsi aux chenilles de se développer aux dépens de cette plante sans être exposées à de fortes concentrations de nicotine (Musser et al., 2002).

- de jeunes chenilles de *M. sexta*, contraintes de se développer sur des plants de tabac dont les systèmes de défenses ont été préalablement induits, présentent de fortes mortalités et les survivantes ont une croissance très ralentie (van Dam et al., 2000). Lorsqu'elles le peuvent, ces chenilles généralement sédentaires, vont quitter rapidement la plante induite pour rejoindre une plante non induite (van Dam et al., 2000).

De la même façon qu'en présence de défenses constitutives, certains insectes phytophages se sont donc adaptés au cours de l'évolution pour parvenir à contourner les défenses induites. Ce type de défense s'est donc très certainement développé et maintenu chez les plantes pour des raisons de ratio coût/bénéfice avantageux. Ainsi les dépenses métaboliques sont adaptées aux stress subits par la plante. Dans un environnement fluctuant par la nature et l'intensité des stress engendrés sur les plantes, celles qui ont pu développer une réponse adaptée au stress subit ont été avantagées.

Les mécanismes précédemment décrits peuvent être qualifiés de système de défenses induites directes. Les défenses induites peuvent également s'exprimer de façon indirecte par le biais de l'attraction des ennemis naturels des phytophages. Dans de nombreuses associations plantes-phytophages, il a été montré que l'attaque des herbivores induisait l'émission par les plantes d'un « bouquet » de composés volatils attractifs vis-à-vis des prédateurs ou des parasitoïdes des insectes phytophages (Dicke et Sabelis, 1988 ; McAuslane et al., 1991 ; Vet et Dicke, 1992 ; Cortesero et al., 1997 ; De Moraes et al., 1998). Ces espèces entomophages, en se nourrissant aux dépens des herbivores, vont dans certains cas permettre une diminution des dégâts engendrés sur les végétaux par ceux-ci. Par exemple, lorsque les acariens phytophages, *Tetranychus urticae* consomment les feuilles du haricot de Lima (*Phaseolus lunatus*), il y a émission par les plantes de composés volatils qui attirent leurs prédateurs, *Phytoseiulus persimilis* (Dicke et al., 1990). De même, de jeunes plants de maïs (*Zea mays*), émettent un bouquet de composés volatils totalement différents lorsqu'ils sont sains ou lorsqu'ils sont attaqués par les chenilles du lépidoptère *Spodoptera exigua*. Ce bouquet représente alors un signal de la présence de l'hôte pour le parasitoïde *Cotesia marginiventris* (Turlings et al., 1990). Cette émission de composés volatils est systémique, les feuilles non attaquées émettant également des substances attractives pour l'hyménoptère (Turlings et Tumlinson, 1992). Ce phénomène a été mis en évidence aussi bien lors d'expériences de laboratoire que lors d'expériences de terrain (Bernasconi et al., 2001). Il semble donc que dans la nature, lors d'une attaque, les plantes soient capables, pour se protéger, d'émettre des signaux indiquant la présence d'une proie potentielle pour l'entomophage (Bernasconi et al., 2001 ; Kessler et Baldwin, 2001).

Dans le cas d'une attraction des prédateurs des phytophages, il est clair que la plante pourra tirer un bénéfice immédiat de l'émission de ces substances volatiles, puisque les dégâts engendrés par l'herbivore sont stoppés dès la découverte de la proie et sa consommation par le prédateur. En revanche, lors de l'attraction du parasitoïde, l'herbivore continue généralement à se nourrir même lorsqu'il est parasité, les bénéfices pour la plante sont alors moins évidents et le concept de défense indirecte peut être de ce fait remis en cause (van der Meijden et Klinkhamer, 2000). Cependant même si les parasitoïdes ne sont pas capables de provoquer immédiatement une diminution des dégâts engendrés par les herbivores, leur impact sur les populations de phytophages peut se faire sentir dès la deuxième génération (Sabelis et Bruin, 2002). De plus, dans certains systèmes tritrophiques plantes-herbivores-parasitoïdes, l'attraction des hyménoptères parasitoïdes par les plantes attaquées se traduit par un gain de fitness immédiat pour la plante (van Loon et al., 2000 ; Fritzsche-Hoballah et Turlings, 2001). Les relations liant les plantes et les parasitoïdes comme celles liant les plantes et les prédateurs auraient donc pu évoluer dans de nombreux cas, vers le mutualisme, chacun des deux protagonistes bénéficiant alors de cette association (Dicke, 1994 ; Takabayashi et Dicke, 1996 ; van Loon et al., 2000).

Spécificité de la réponse des plantes

D'une manière générale, les plantes répondent donc aux divers stress par la mise en place de systèmes de défense agissant directement ou indirectement sur leurs agresseurs. Dans certains cas cette réponse semble parfaitement adaptée aux attaques des insectes phytophages en leur étant spécifique. Ainsi, les réponses de la plante à des brisures mécaniques ou à l'attaque d'un herbivore peuvent être différentes qualitativement ou quantitativement. Une différence qualitative se traduit par la production de composés de nature différente selon le traitement infligé à la plante. Une différence quantitative se traduit par la production de composés identiques mais variant dans leurs concentrations relatives. Selon Dicke (1999a), les réponses des plantes différant qualitativement représentent un plus fort degré de spécificité que les réponses différant quantitativement.

Ainsi, le maïs émet de fortes quantités de sesquiterpènes quelques heures après le début de l'attaque par *S. exigua*, alors que de très faibles quantités sont émises suite

à des coupures mécaniques de la plante (Turlings et al., 1990 ; 1993). Lorsque des régurgitations larvaires sont rajoutées à ces coupures, il y a de nouveau une forte émission de sesquiterpènes particulièrement attractifs pour le parasitoïde *C. marginiventris* (Turlings et al., 1990 ; 1993 ; Tumlinson et al., 1993 ; fig. 1). Des substances présentes dans la salive des herbivores et mises en contact avec les cellules végétales durant l'alimentation du phytophage expliquent la spécificité de la réponse des plantes aux insectes (Mattiacci et al., 1995 ; Alborn et al., 1997). En effet, la N-17-hydroxylinolenoyl-L-glutamine, (volicitine) présente dans les régurgitations larvaires de *S. exigua* déclenche l'émission d'un spectre de composés volatils spécifique de l'attaque de l'herbivore, lorsqu'elle est ajoutée aux blessures (Alborn et al., 1997 ; Schmelz et al., 2001). La volicitine en agissant sur les lipides membranaires des cellules végétales provoque la libération d'acide linolénique qui est converti en acide jasmonique par activation de la voie de biosynthèse de l'acide octadécanoïque dans la plante et permet ainsi l'induction de l'émission de substances volatiles (Paré et al., 1998 ; Schmelz et al., 2003).

La réponse de la plante aux attaques peut être également spécifique de l'espèce consommatrice, du type de dégât infligé ou même du stade larvaire attaquant la plante. Ainsi, des plants de tabac attaqués par des chenilles de *H. virescens* ou de *H. zea* émettent un spectre de composés volatils qui diffère par les concentrations en β -ocimène ou en β -caryophyllène. Ces différences sont perçues par le parasitoïde *Chardiochiles nigriceps* qui est préférentiellement attiré par les plants de tabac attaqués par *H. virescens*, son espèce hôte (De Moraes et al., 1998). Chez les plants de tomate, la réponse mise en place est également différente selon le mode de nutrition de l'herbivore et donc du type de dégâts infligé à la plante. Les attaques de chenilles défoliatrices (*H. zea*), de mineuses (*Liriomyza trifolii*) ou d'acariens (*Aculops lycopersici*) conduisent à différentes augmentations de concentrations de polyphénol oxydase, de peroxidase, de lipoxygénase ou d'inhibiteurs de protéases dans les feuilles de la plante, (Stout et al., 1994). Les plants de maïs infestés par des jeunes larves de *Pseudaletia separata* (stade 1 à 3) émettent un spectre volatil différent de celui émit lors de l'attaque par des larves plus âgées (stade 4 à 6). Cette différence de composition de bouquet volatil représente un signal fiable pour le parasitoïde *Cotesia kariyai* qui ne parasite que les jeunes larves (Takabayashi et al., 1995).

La réponse des plantes induite par les phytophages implique l'activation de voies métaboliques permettant ces changements physiologiques.

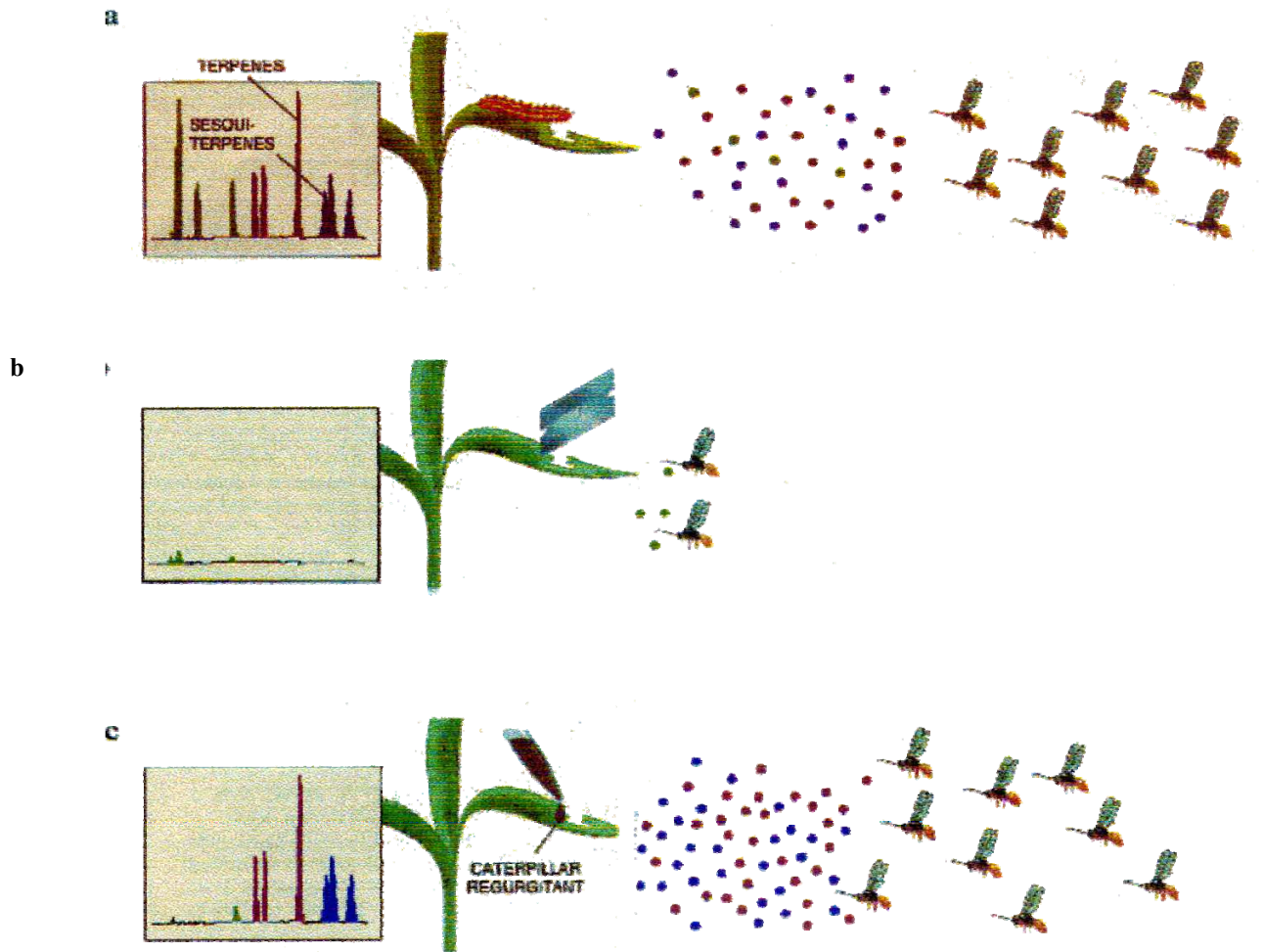


Fig. 1: *Attraction des parasitoïdes par les odeurs émises par des feuilles de maïs :*

a: attaquées par une chenille hôte

b: brisées mécaniquement

c: brisées mécaniquement + régurgitations de chenilles.

(D'après Tumlinson et al., 1993).

Mécanismes biochimiques des systèmes de défense induite

Lors de la mise en place de la réponse physiologique de la plante à l'attaque d'un herbivore, il semblerait comme précisé précédemment que la voie de biosynthèse octadécanoïque mettant en jeu l'acide jasmonique occupe une place essentielle (Farmer et Ryan, 1992 ; Howe et al., 1996). En effet cette molécule interagit avec de nombreux gènes, en activant notamment leur expression. Ainsi l'acide jasmonique va pouvoir activer les gènes codant pour des composés secondaires agissant directement sur l'herbivore tels que les inhibiteurs de protéases (Johnson et al., 1989) ou la nicotine (Baldwin, 1996 ; 1999), ou pour des composés secondaires volatils impliqués dans les défenses indirectes de la plante (Baldwin et Preston, 1999 ; fig. 2). Ainsi cette molécule clé dans les réactions de défense des plantes peut être utilisée pour mimer l'attaque d'un herbivore. L'application d'acide jasmonique exogène induit dans certains cas des réponses similaires à celles obtenues suite à l'attaque d'un insecte (Thaler et al., 1996 ; Rodriguez-Saona et al., 2001). Lors d'expériences de terrain, l'application d'acide jasmonique exogène sur des plants de tomate, provoque l'attraction des guêpes parasitoïdes et augmente ainsi les taux de parasitisme des chenilles (Thaler, 1999). En revanche l'application d'acide jasmonique sur le haricot de Lima, induit un bouquet de composés volatils sensiblement différent de celui émit lors de l'infestation par *T. urticae*, provoquant une nette préférence des acariens prédateurs, *P. persimilis*, vis-à-vis des haricots infestés (Dicke et al., 1999). Il semble donc que d'autres voies métaboliques en plus de celle de l'acide jasmonique, puissent être activées lorsque la plante réagit à une infestation naturelle de *T. urticae*. De plus, l'accumulation d'acide jasmonique dans les cellules végétales se produit également lors de blessures artificielles de certaines plantes (Creelman et al., 1992 ; Baldwin et al., 1997). Cette molécule ne peut donc pas à elle toute seule expliquer la spécificité de la réponse des plantes à l'attaque d'un herbivore. C'est ainsi que chez le maïs, l'attaque des larves de *S. exigua* induit non seulement l'accumulation de l'acide jasmonique par le biais de la volicitine mais déclenche en plus l'augmentation de la concentration d'éthylène (Schmelz et al., 2003). Dans ce système l'acide jasmonique et l'éthylène agiraient donc en synergie pour l'induction des substances volatiles attractives pour le parasitoïde (Schmelz et al., 2003).

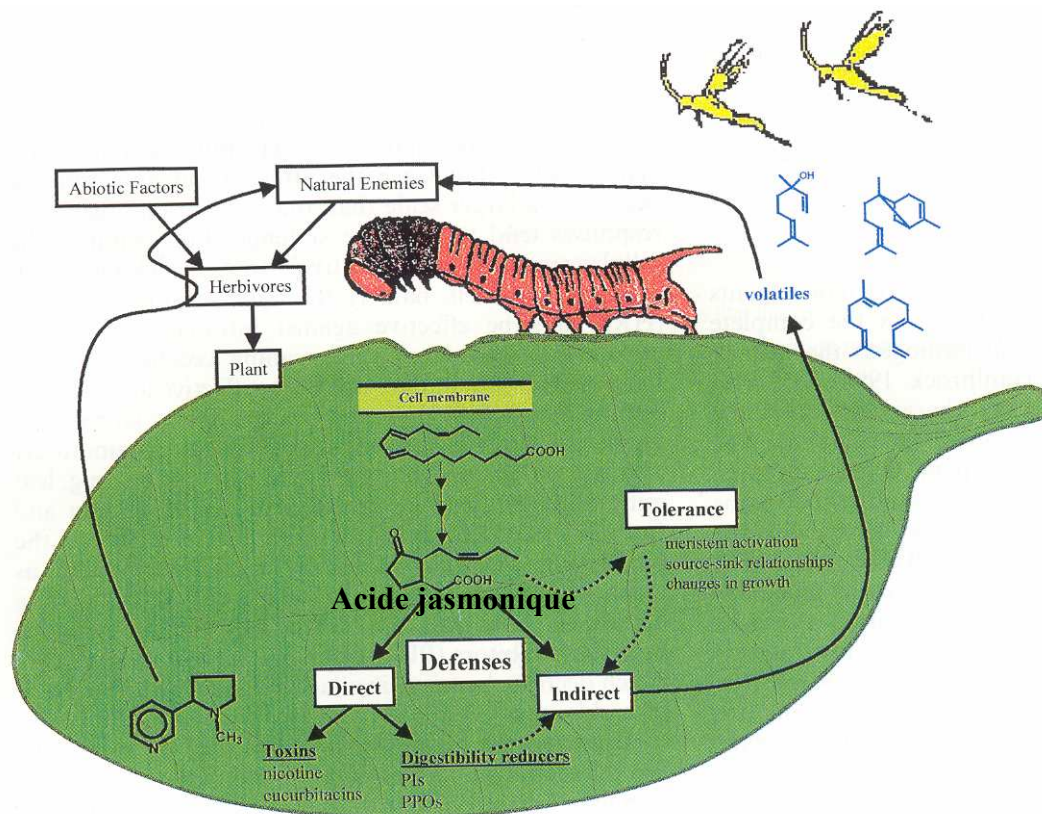


Fig. 2: Rôle de l'acide jasmonique dans les réactions de défense induites des plantes (d'après Baldwin et Preston, 1999). La cascade octadécanoïque occupe un rôle central dans l'induction des défenses des plantes suite à une attaque de phytophages. L'acide jasmonique peut induire les défenses directes et indirectes, et également mettre en place des réactions limitant les conséquences de l'attaque (tolérance).

La voie de biosynthèse octadécanoïque mettant en jeu l'acide jasmonique est donc très importante dans la réponse des plantes aux attaques des insectes. Toutefois d'autres phytohormones peuvent jouer un rôle dans les systèmes de défense des plantes :

- l'acide salicylique est la molécule clé dans la réponse des plantes à l'infection de pathogènes (Malamy et al., 1990) mais intervient également en synergie avec l'acide jasmonique dans la mise en place de défenses indirectes chez *Arabidopsis* (van Poecke et Dicke, 2001).

- l'éthylène, comme on l'a vu précédemment, intervient chez le maïs là encore en synergie avec l'acide jasmonique dans l'induction de substances volatiles (Schmelz et al., 2003). De plus, cette molécule est également connue pour induire la biosynthèse

de composés chimiques impliqués dans les systèmes de défenses directes, telle que la chitinase (Karban et Baldwin, 1997).

- l'acide abscissique est une hormone végétale impliquée notamment dans les processus de résistance aux stress hydriques mais peut également avoir un rôle dans les systèmes de défenses des plantes. En effet, des blessures occasionnées sur des plants de tomates ou de pommes de terre, induisent une augmentation de la concentration en acide abscissique qui va déclencher la biosynthèse systémique d'inhibiteurs de protéases (Peñas –Cortès et al., 1989).

Applications potentielles de l'étude des relations plantes-insectes

Les plantes ont donc acquis au cours de l'évolution tout un panel de stratégies pour se défendre face à leurs agresseurs que sont notamment les insectes phytophages. Toutefois, que ces systèmes de défenses soient constitutifs ou induits, directs ou indirectes, leurs agresseurs par le développement de stratégies contre-défensives sont toujours présents. Ainsi un équilibre dynamique se crée entre agresseurs et agressés pour le maintien d'une formidable biodiversité. Les relations entre les plantes et les insectes phytophages et entomophages sont donc très complexes et en permanente évolution. Il apparaît clairement que les composés secondaires des plantes ont un rôle considérable dans les processus de défense mais également dans l'établissement, le maintien et l'évolution des relations multitrophiques. Les recherches entreprises visant à mieux connaître et mieux comprendre ces relations permettent d'éclairer certains concepts fondamentaux d'écologie chimique ou d'écologie évolutive mais en plus d'apporter à l'homme de nouvelles perspectives pour la protection des cultures vis-à-vis des insectes phytophages.

Ainsi les études et la compréhension des mécanismes et du mode d'action des défenses constitutives et induites, directes et indirectes des plantes d'une part et les mécanismes de résistance physiologique et comportementale développés par les phytophages, d'autre part, peuvent aboutir (et aboutissent déjà) à la mise en place de nouvelles stratégies permettant de lutter ou de contrôler les populations de ravageurs des cultures. En effet, une très bonne connaissance de la biologie de la plante, des ravageurs et de leurs ennemis naturels peut déboucher sur la mise en place de

différents types de stratégies permettant la protection des cultures et des denrées stockées.

- Une de ces stratégies est la lutte biologique : sans rentrer dans les détails, nous pouvons définir cette méthode de lutte comme l'ont proposé van Driesche et Bellows (1996) : « *Biological control is a population-level process in which one species' population lowers the numbers of another species by mechanisms such as predation, parasitism, pathogenicity, or competition* » (la lutte biologique est un processus agissant au niveau des populations et par lequel la densité de population d'une espèce est abaissée par l'effet d'une autre espèce qui agit par prédation, parasitisme, pathogénécité ou compétition). La lutte biologique est donc l'utilisation d'organismes vivants dans le but de diminuer la densité de la population d'un ravageur. Plusieurs groupes d'organismes peuvent être utilisés pour la lutte contre les insectes ravageurs : les pathogènes, les prédateurs et les parasitoïdes. Toutefois, une étude récente a montré que pour 78 espèces d'herbivores ayant fait l'objet de tables de survie, les parasitoïdes ressortent comme le groupe causant la plus forte mortalité (Hawkins et al., 1997). Cependant, depuis les cent dernières années, sur les 1200 introductions d'ennemis naturels faites dans le monde, seulement 17% d'entre elles ont permis de contrôler efficacement le ravageur visé (Boivin, 2001). Il semble donc qu'une meilleure connaissance du mode de vie des différents organismes impliqués soit nécessaire pour la réussite de telles opérations.

- Une autre stratégie est l'utilisation de composés chimiques issus des plantes, puisqu'elles ont développé au cours de leur évolution tout un arsenal chimique d'une diversité considérable. Il semble bien évident que parmi toutes ces substances potentiellement actives, certaines puissent faire l'objet d'applications agronomiques. Dès l'Antiquité, les Chinois, les Grecs et les Romains ont utilisé comme insecticides des plantes ou des extraits de plantes produisant du soufre ou de l'arsenic (Philogène et al., 2002). En Afrique, depuis très longtemps, les extraits de plantes jouent un rôle important pour la préservation des denrées stockées dans les greniers traditionnels (Sanon et al., 1998 ; Philogène et al., 2002). Dans l'agriculture moderne, grâce à l'étude des défenses directes des plantes et leur mode d'action sur les insectes, de nouvelles molécules végétales ont été découvertes et utilisées pour la protection des cultures. C'est le cas entre autres des pyrèthres, composés secondaires des plantes de la famille des astéracées. Les dérivés plus stables de cette molécule que sont les pyrèthrinoïdes sont maintenant utilisés commercialement dans le monde entier. Des recherches toujours plus approfondies sur le mode d'action de ces substances

végétales peuvent donc permettre de découvrir des composés végétaux à fort intérêt agronomique.

- Il est également possible de stimuler directement les défenses naturelles des plantes (par exemple par application d'éliciteurs ou d'acide jasmonique exogène) pour augmenter l'efficacité des défenses directes ou indirectes. Toutefois, l'induction des défenses chez les plantes semble très souvent avoir un coût métabolique (Baldwin, 1998) qui pourrait se traduire par une perte de rendement en absence d'herbivores. Ces méthodes ne sont pour l'instant qu'au niveau expérimental et de nombreuses recherches doivent être entreprises pour une application agronomique efficace. Des études peuvent être également menées pour rechercher les variétés les plus susceptibles d'attirer les ennemis naturels des ravageurs. Par exemple, certaines variétés de maïs lorsqu'elles sont attaquées sont nettement plus attractives que d'autres pour l'ennemi naturel du ravageur (Fritzsche-Hoballah et al., 2002).

L'induction des défenses directes ou indirectes de la plante, les lâchers d'ennemis naturels ou la recherche de molécules végétales recyclables par l'écosystème, sont des techniques qui peuvent s'avérer prometteuses pour la lutte contre les ravageurs. La recherche d'alternatives de lutte, du fait des problèmes environnementaux posés par les traitements insecticides chimiques, est devenue indispensable. Toutefois pour la mise en place de ces différentes techniques, il est bien évidemment nécessaire de comprendre dans leur ensemble les processus de défenses naturelles des plantes et leurs interactions avec les différents niveaux trophiques. Le champ d'investigation est donc énorme et les applications très vastes, malgré les nombreuses études déjà entreprises.

C'est dans ce contexte, au croisement de la recherche purement fondamentale et de la recherche appliquée que, lors de ce travail, nous nous sommes intéressés aux composés secondaires produits par le poireau, *Allium porrum*.

Présentation du modèle d'étude

➤ La plante : *Allium porrum*

A. porrum appartient à la famille des alliacées. Le genre *Allium* regroupe de nombreuses espèces dont un certain nombre sont cultivées, telles que, le poireau, l'oignon (*A. cepa*), l'ail (*A. sativum*) ou la ciboulette (*A. schoenoprasum*) qui synthétisent des composés secondaires soufrés à l'origine de l'odeur particulière qui s'en dégage lorsqu'ils sont coupés (Virtanen, 1965). Le poireau est inconnu à l'état sauvage, aussi est-il souvent considéré comme une forme cultivée de l'ail d'orient (*A. ampeloprasum*). Il semble dériver de cette espèce et il est même généralement classé comme une sous-espèce ou une variété de celui-ci (Bonnet, 1976). Le poireau est constitué d'une tige plateau, d'un système racinaire fasciculé et d'un ensemble de feuilles engainantes emboîtées les unes dans les autres (Freeman, 1975 ; fig. 3). La hampe florale se développe au milieu de l'éventail des feuilles. Les organes végétatifs se forment et croissent pendant la première année et la hampe florale se met en place lors de la deuxième année, c'est donc une plante bisannuelle (Bonnet, 1976).

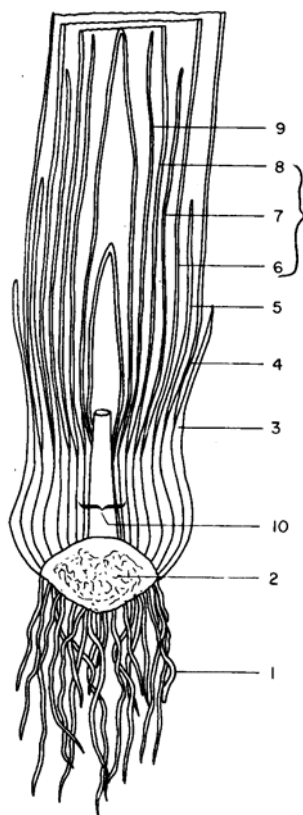


Fig. 3: Coupe longitudinale de poireau (d'après Freeman, 1975).
1: racines ; 2: tige-plateau ; 3-10: feuilles.

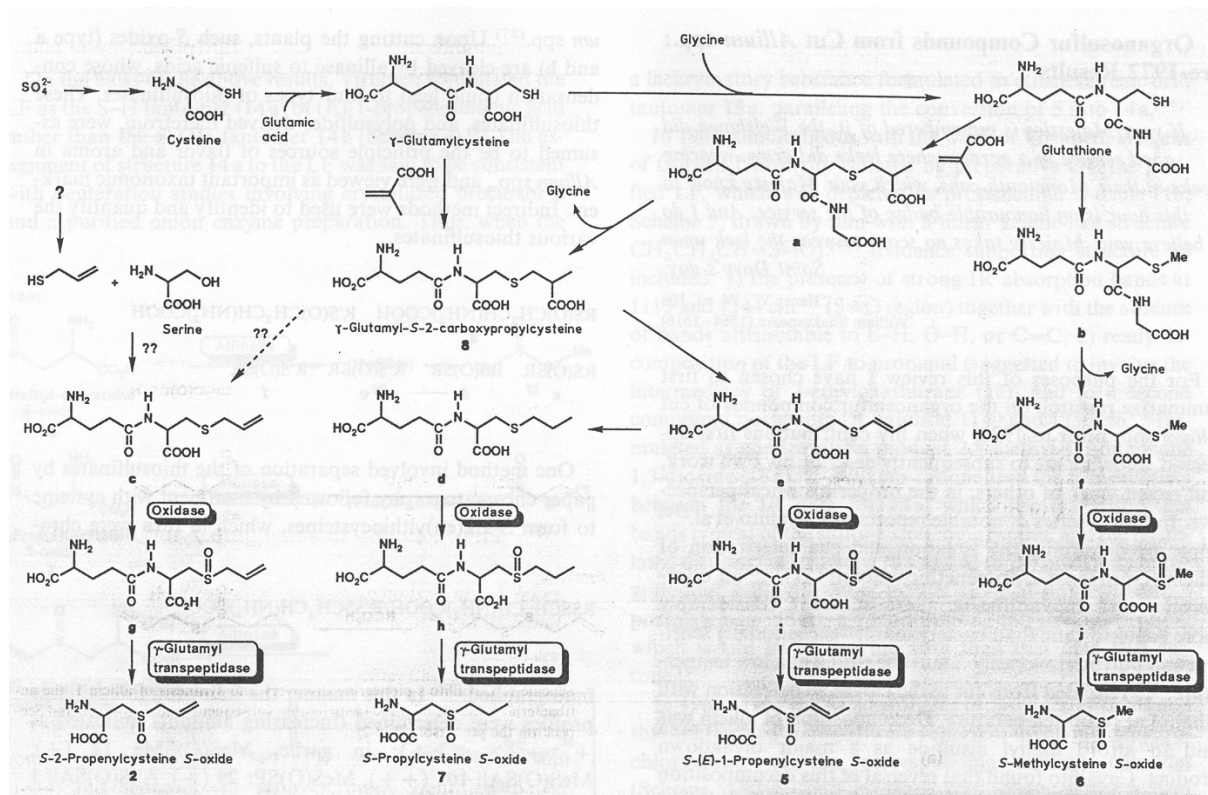


Fig. 4a: Biosynthèse des précurseurs (alk(en)ylcystéine sulfoxides) des substances volatiles soufrées chez les *Allium* (d'après Block, 1992).

a: S-2-carboxypropylglutathione ; b: S-méthylglutathione ; c: γ -glutamyl-S-2-propenylcystéine ; d: γ -glutamyl-S-propylcystéine ; e: γ -glutamyl-S-1-propenylcystéine ; f: γ -glutamyl-S-méthylcystéine ; g: S-oxyde de γ -glutamyl-S-2-propenylcystéine ; h: S-oxyde de γ -glutamyl-S-propylcystéine ; i: S-oxyde de γ -glutamyl-S-1-propenylcystéine ; j: S-oxyde de γ -glutamyl-S-méthylcystéine.

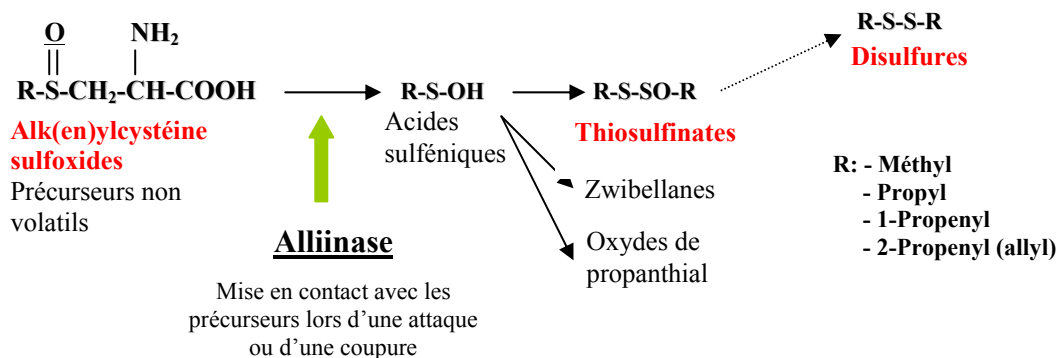


Fig. 4b: Réaction enzymatique permettant la biosynthèse des substances volatiles soufrées à partir des alk(en)ylcystéine sulfoxides chez les *Allium* (d'après Auger et al., 1989 et Jaillais et al., 1999).

Les composés secondaires produits par le poireau auxquels nous nous intéresserons tout particulièrement au cours de cette étude sont les acides aminés soufrés non protéiques. En effet, dans le genre *Allium*, en plus des acides aminés habituels tels que la cystéine, la cystine ou le glutathion et leurs dérivés peptidiques, des alk(en)ylcystéine sulfoxides et leurs dérivés peptidiques de l'acide glutamique sont produits en forte quantité, leur proportion pouvant atteindre 5% du poids sec (Virtanen, 1965). Ces alk(en)ylcystéine sulfoxides formés à partir de la cystéine et de l'acide glutamique (Block, 1992 ; fig. 4a) sont au nombre de quatre : le S-méthyl-L-cystéine sulfoxide (MCSO) présent chez le poireau en faible proportion mais prépondérant chez certaines espèces sauvages ; le S-propyl-L-cystéine sulfoxide (PCSO) et le S-1-propenyl-cystéine sulfoxide (PeCSO), présents en forte proportion chez le poireau ; et le S-allyl-L-cystéine sulfoxide (ACSO) inexistant chez le poireau mais prépondérant chez l'ail. Les proportions de ces quatre composés varient non seulement d'une espèce à l'autre mais également à l'intérieur d'une espèce selon l'organe, la variété, le stade de développement et les conditions environnementales (Boscher et al., 1995), mais nous ne savons pas à l'heure actuelle si la concentration de ces composés peut être modifiée par l'attaque d'un insecte. Ces dérivés de la cystéine semblent très spécifiques des *Allium* puisqu'il n'en a été trouvé qu'en petite quantité dans un faible nombre d'espèces végétales (Auger et Thibout, 2002). Ces acides aminés soufrés sont stockés dans le cytoplasme des cellules sous forme de dipeptides et libérés sous l'influence de la γ -glutamylpeptidase (Lancaster et Collin, 1981). Ils sont les précurseurs de substances soufrées volatiles. En effet, lors de la destruction des cellules végétales, par brisure mécanique ou lors de l'attaque d'un phytophage, ils sont mis en présence d'une enzyme située dans les vacuoles, l'alliinase ou alliinylsulfinyl lyase (EC 4.4.1.4) qui provoque après la coupure de la liaison C-S, la synthèse de toute une série de composés soufrés volatils (Jaillais et al., 1999 ; fig. 4b). Cette réaction enzymatique conduit à la formation d'acide sulfénique dont les molécules se réarrangent deux à deux pour former des thiosulfinates symétriques ou mixtes selon les précurseurs présents. Dans le cas du PeCSO, il peut y avoir formation de zwibellanes ou d'oxyde de propanethial responsable de l'effet lacrymogène notamment chez l'oignon (Virtanen et Spare, 1963 ; Jaillais et al., 1999). Les thiosulfinates relativement instables peuvent donner naissance sous certaines conditions aux disulfures par la perte de l'atome d'oxygène. Ces composés volatils et notamment les thiosulfinates sont eux aussi très spécifiques des *Allium*, les disulfures tels que le disulfure de diméthyle (DMDS) le sont un peu moins, ils sont par exemple

émis par quelques végétaux dont plusieurs espèces de crucifères (Kjaer et al., 1978). Ces composés secondaires soufrés des *Allium* pourraient donc représenter un système de défense pour les plantes productrices. En effet, certaines études ont montré que les substances volatiles émises par les *Allium* sont toxiques vis-à-vis d'un très large spectre d'organismes en atmosphère confinée et semblent agir comme barrière odorante répulsive vis-à-vis d'un grand nombre d'espèces d'insectes phytophages (Thibout et al., 1996 ; Thibout et Auger, 1997). Toutefois, nous ne savons pas encore comment ces composés agissent sur la physiologie des insectes et comment ces derniers peuvent résister en présence de ces substances.

Le poireau et les *Allium* en règle générale ne sont attaqués dans la nature que par un faible nombre d'espèces d'insectes phytophages (Arnault et al., 1986). Parmi les espèces généralistes, à l'exception de *Thrips tabaci*, seules quelques espèces de lépidoptères telle *Cacoecimorpha pronubana* ou *Agrotis ipsilon* sont rencontrées dans les champs de poireaux cultivés et ne sont pas considérées comme des ravageurs sérieux des cultures par les producteurs de poireaux. Deux espèces d'insectes phytophages se sont adaptées et spécialisées sur les cultures d'*Allium* : le diptère *Delia (Hylemyia) antiqua*, abondant principalement dans les cultures d'oignon ; et le lépidoptère *Acrolepiopsis assectella* considéré comme le seul insecte phytophage capable de provoquer des dégâts importants sur les cultures de poireau en plein air, (*Thrips tabaci* est également un ravageur nuisible aux cultures de poireaux mais principalement au niveau des cultures en serre ou sous tunnel). Ce très faible nombre d'espèces d'insectes capables de se développer aux dépens du poireau laisserait donc à penser que cette plante possède des défenses naturelles efficaces contre ses agresseurs et les composés secondaires soufrés sont donc pressentis pour jouer un rôle important dans les processus de défenses de la plante.

➤ **Le phytophage *Acrolepiopsis assectella* et son ennemi naturel, le parasitoïde *Diadromus pulchellus* (fig. 5 a-d & fig. 6)**

La teigne du poireau, *A. assectella* est strictement inféodée aux *Allium* et plus particulièrement au poireau. Ce microlépidoptère appartenant à la famille des Acrolepiinae a été décrit par Frediani (1954) et sa biologie a été résumée par Labeyrie (1966). Les femelles pondent sur les limbes des feuilles de poireau ; après éclosion des œufs, 5 à 8 jours plus tard, les larves néonates rentrent dans le parenchyme foliaire de la plante dans lequel elles vivent en mineuses durant les premiers stades larvaires.

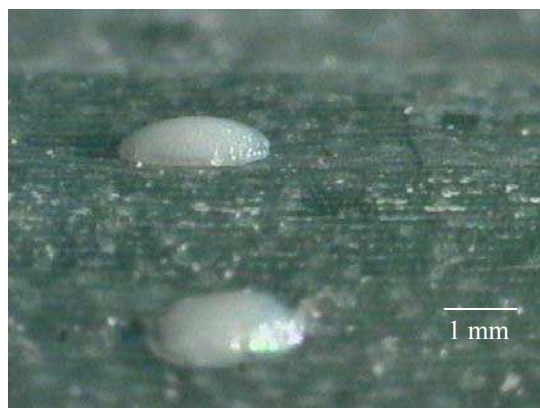


Fig. 5a: Œufs d'*A. assectella* (cliché JC Biémont)



Fig. 5b: Larve d'*A. assectella* (cliché JC Biémont)



Fig. 5c: Cocon d'*A. assectella* (cliché JC Biémont)

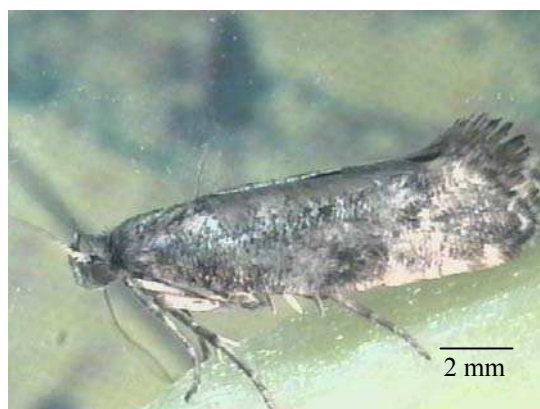


Fig. 5d: Adulte d'*A. assectella* (cliché JC Biémont)

Les larves de 5^{ème} stade sortent ensuite de leur mine et tissent peu de temps après un cocon de soie dans lequel elles effectuent leur nymphose pendant 10 à 20 jours selon les conditions climatiques. L'activité des adultes est essentiellement nocturne ou crépusculaire (Labeyrie, 1956 ; Rahn 1966 ; Thibout, 1978). Le nombre de générations de cette espèce polyvoltine varie de 2 à 8 selon les conditions climatiques (Bonnet, 1976). Son aire de répartition s'étend à toute l'Europe et probablement au Maghreb où elle a été signalée en Algérie dans les cultures de poireaux (Lecomte, 1976). La teigne est capable de provoquer des dégâts très importants sur les poireaux et, dans les cas extrêmes, les plantes peuvent même être complètement défoliées et dépérir (Boscher, 1979).

Comme toutes les espèces phytophages spécialistes, la teigne du poireau a besoin de sa plante hôte pour effectuer l'ensemble de son développement. En effet la plante hôte stimule l'ovogenèse et la ponte des femelles (Cadeilhan, 1965a et b ; Rahn, 1971 ; Thibout, 1974), elle accroît l'attractivité de celles-ci vis-à-vis des mâles dans la nature (Rahn, 1968), ainsi que l'activité locomotrice des deux sexes pendant la scotophase (Lecomte et Thibout, 1982). Les composés secondaires soufrés produits et émis par la plante vont également être utilisés par cet insecte spécialiste. Ainsi les substances non volatiles, les alk(en)ylcystéine sulfoxides, sont phagostimulantes pour les larves (Al-Rouz et Thibout, 1989) et déclenchent partiellement le comportement de ponte chez les femelles (Thibout et Auger, 1996). Les substances volatiles émises par la plante, et tout particulièrement les thiosulfates, s'avèrent quant à elles, très attractives vis-à-vis des adultes des deux sexes et permettent donc très certainement aux teignes de découvrir la plante hôte dans l'écosystème (Lecomte et Thibout, 1981). De plus la séquestration de ces substances soufrées permet la protection des larves vis-à-vis de prédateurs généralistes telle la fourmi *Formica fusca* (Nowbahari et Thibout, 1992). Les composés secondaires soufrés du poireau semblent donc positifs pour la teigne du poireau et n'interviennent probablement pas dans les systèmes de défenses constitutifs de la plante vis-à-vis de cet insecte comme cela pourrait être le cas chez d'autres espèces phytophages. Toutefois, les chrysalides de ce lépidoptère sont très régulièrement victimes dans la nature de parasitisme par l'hyménoptère parasitoïde Ichneumonidae, *Diadromus pulchellus*. Cet endoparasitoïde solitaire est une espèce spécialiste ne parasitant dans la nature que les chrysalides d'*A. assectella* (Labeyrie, 1960 ; Rojas-Rousse, 1980). Son activité locomotrice est augmentée en présence des composés secondaires émis par le poireau, et les fèces des larves émettant des

disulfures issus des alk(en)ylcystéine sulfoxides produits par le poireau sont attractives (Lecomte et Thibout, 1986). Les substances soufrées du poireau pourraient donc avoir un rôle dans les systèmes de défense indirects de la plante.



Fig. 6: Femelle de *D. pulchellus* sur nymphe d'*A. assectella* (cliché S Dugravot).

Objectifs de l'étude

Cette étude sera focalisée sur les composés secondaires soufrés produits par les poireaux. Les effets qu'ils exercent au niveau physiologique et comportemental sur différentes espèces d'insectes satellites ou non du poireau seront étudiés afin de tenter d'analyser leur rôle éventuel dans les processus de défense naturelle de la plante. En parallèle, et de façon plus implicite, les possibilités d'utilisation de ces substances soufrées contre divers organismes nuisibles aux activités humaines, seront évoquées.

Il s'agira, dans un premier temps, par la mise au point d'un protocole expérimental simple, de confirmer la toxicité de ces substances vis-à-vis de différents organismes et de comparer la sensibilité des différentes espèces testées avec la sensibilité d'*A. assectella* vis-à-vis de ces substances soufrées. Puis, par des expériences d'électrophysiologie et de spectrophotométrie les mécanismes d'action de ces substances soufrées sur le métabolisme respiratoire et le système nerveux des insectes seront étudiés afin d'analyser comment ces composés provoquent la mort des

organismes. Enfin, les mécanismes éventuels de résistance développés par les insectes phytophages confrontés à ces composés soufrés seront recherchés.

Dans un deuxième temps, la réponse physiologique des poireaux induite par l'attaque des larves d'*A. assectella* sera analysée. Puis, nous étudierons les conséquences de cette réponse sur le comportement et le développement des teignes confrontées à des plantes préalablement attaquées afin d'analyser si cette réponse peut être considérée comme un système de défense direct induit. Enfin, les conséquences de la réponse de la plante à l'attaque des larves d'*A. assectella* sur le comportement de recherche de l'hôte par *D. pulchellus* et donc la possibilité de considérer cette réponse comme un système de défense induit indirect seront également étudiés.

Pour finir, un scénario hypothétique des défenses chimiques du poireau basé sur les résultats obtenus sera présenté.

1^{ERE} PARTIE :

**TOXICITE ET MODE D'ACTION DES COMPOSES
SECONDAIRES DES *ALLIUM* SUR DIFFERENTS
ORGANISMES ET STRATEGIES DE RESISTANCE
DEVELOPPEES PAR DES INSECTES CONFRONTES A CES
SUBSTANCES**

INTRODUCTION A LA 1^{ERE} PARTIE

Les plantes appartenant au genre *Allium*, comme cela a déjà été évoqué en introduction générale, sont caractérisées par leur capacité à produire des composés secondaires soufrés. Ces substances soufrées, comme la plupart des composés secondaires des végétaux, sont pressenties pour jouer un rôle dans les processus de défenses naturelles des *Allium*. Des expériences réalisées au laboratoire depuis quelques années tendent à confirmer que les substances volatiles émises par les *Allium* lors de la lésion des tissus végétaux présentent des propriétés insecticides (Auger et al., 1994 ; 1999 ; 2002).

Lors de cette première partie nous nous intéresserons tout d'abord à l'étude de la toxicité des substances soufrées volatiles émises par les *Allium*, les thiosulfates et leurs produits de dégradation, les disulfures (chapitre 1). Dans un deuxième temps le mode d'action de ces substances soufrées sur la physiologie des insectes sera déterminé (chapitre 2), puis enfin, nous rechercherons les stratégies sélectionnées par certains insectes leur permettant une meilleure tolérance face à ces substances soufrées lorsqu'ils y sont confrontés (chapitre 3).

Toutes les expériences réalisées lors de cette première partie ont été effectuées avec une substance soufrée purifiée. Pour des raisons d'ordre pratique, le DMDS composé volatil stable disponible dans le commerce et particulièrement abondant dans l'environnement des *Allium* a été choisi pour la réalisation de cette étude. Les thiosulfates particulièrement instables à l'état pur, non disponibles dans le commerce et donc nécessitant une synthèse au laboratoire ont été testés auparavant (Auger et al., 1994 ; 1999 ; 2002) et leur activité pourra ainsi être comparée à celle du DMDS.

Le choix des insectes utilisés dans les trois chapitres de cette première partie a été orienté principalement pour répondre à des questions d'ordre appliqué et notamment en raison des contrats passés avec un industriel. En effet, si elles sont confirmées, les propriétés insecticides des substances soufrées émises par les *Allium* et leur très forte volatilité pourraient s'avérer être très intéressantes pour l'utilisation de ces substances en fumigation dans la protection des denrées stockées ou la désinfection des sols. Toutefois l'étude de la toxicité, du mode d'action et des phénomènes de résistance éventuelle développés par les insectes confrontés à ces substances permettront également d'analyser l'importance de ces composés secondaires soufrés produits par les *Allium* dans les processus de défenses naturelles de ces plantes.

CHAPITRE 1 :

TOXICITE DES SUBSTANCES SOUFREES DES *ALLIUM* SUR LES INSECTES

1.1/ Introduction

Les composés secondaires des plantes, comme cela a préalablement été évoqué en introduction générale, interviennent fortement dans les processus de défenses naturelles des plantes, par des phénomènes de répulsion d'anti-appétence ou de toxicité. Le mode d'action de ces composés secondaires a donc permis aux plantes de restreindre le nombre d'espèces d'insectes phytophages capables de se développer à leurs dépens.

Dans ce chapitre, nous nous sommes attachés à vérifier la toxicité des composés secondaires soufrés des *Allium* sur différentes espèces d'insectes phytophages ou non, satellites ou non de plantes produisant des composés secondaires soufrés. S'il s'avère que la forte toxicité des composés secondaires soufrés des *Allium* sur les insectes est confirmée, il sera alors certainement possible de comprendre pourquoi les plantes du genre *Allium* ne sont attaquées que par un faible nombre d'insectes phytophages. En effet, lorsqu'un insecte se nourrit aux dépens des feuilles d'un *Allium*, en brisant les cellules végétales lors de la prise alimentaire, il se trouve alors exposé d'une part aux alk(en)yl cystéine sulfoxides et d'autre part aux composés volatils soufrés émis par la plante.

Il s'agira donc dans un premier temps de mettre au point un protocole expérimental fiable pour tester la toxicité du DMDS issu notamment de la dégradation des thiosulfates émis par les *Allium* lors de la lésion des cellules végétales de la plante. Cette molécule, comme cela a été dit précédemment a été choisie pour différentes raisons. En effet, le DMDS est très abondant dans l'environnement proche des *Allium* et pourrait donc très certainement faire partie des composés secondaires entrant dans les processus de défense de ces plantes. De plus cette substance est particulièrement stable sur le plan chimique et donc beaucoup plus pratique d'utilisation que les thiosulfates. Enfin, le DMDS est synthétisé de façon industrielle en grosse quantité et à bas coût et pourrait s'avérer très intéressant pour une éventuelle commercialisation si la forte toxicité de cette substance est confirmée.

Nous avons tout d'abord choisi de tester la toxicité du DMDS vis-à-vis d'un coléoptère ravageur des denrées stockées, non spécialiste des *Allium*, *Callosobruchus maculatus* et son hyménoptère parasitoïde *Dinarmus basalis*. Les larves du coléoptère bruchidé se développent à l'intérieur des graines d'une légumineuse, le niébé, *Vigna unguiculata* et peuvent ainsi provoquer de très grosses

pertes dans les systèmes de stockage du niébé dans les greniers traditionnels en Afrique occidentale (Caswell, 1961). La perte de poids des récoltes peut aller jusqu'à 800 g/kg au Niger et au Burkina Faso (Monge et al., 1995). Pour tenter de contrôler les populations de *C. maculatus* dans les greniers, les fermiers africains introduisent des plantes émettant des substances soufrées. L'étude de la toxicité du DMDS sur *D. basalis*, capable de contrôler efficacement les populations de *C. maculatus* dans les systèmes de stockage du niébé (Sanon et al., 1998) a été réalisée dans le but d'estimer les conséquences de l'introduction de substances soufrées dans les greniers traditionnels sur le contrôle biologique de *C. maculatus* par *D. basalis*.

La toxicité du DMDS vis-à-vis d'un insecte omnivore, la blatte *Periplaneta americana* a également été étudiée. Cette espèce est intéressante car elle est notamment connue pour sa forte résistance aux traitements insecticides, et son anatomie particulière permettra d'étudier le mode d'action du DMDS sur le système nerveux de cette espèce (cf. chapitre 2).

Enfin, la toxicité du DMDS sera analysée chez deux espèces de lépidoptères, la teigne du poireau, *Acrolepiopsis assectella* et la teigne du chou, *Plutella xylostella*, inféodées à des plantes productrices de composés soufrés, respectivement les *Allium* et les crucifères émettant également du DMDS. La sensibilité de ces deux espèces au DMDS sera comparée à celle d'une troisième espèce, le lépidoptère généraliste, *Agrotis ipsilon*, rencontré occasionnellement sur le poireau, afin d'analyser si la spécialisation de ces deux espèces est accompagnée d'une diminution de sensibilité vis-à-vis de cette substance soufrée par rapport à celle d'une espèce généraliste.

1.2/ Matériels et Méthodes

a) Matériel biologique

a₁) Insectes des denrées stockées : *C. maculatus* et son parasitoïde *D. basalis* (fig. 7 & 8)

** Biologie sommaire des insectes*

C. maculatus est un coléoptère Bruchidae cosmopolite des zones chaudes du globe qui se développe aux dépens d'au moins 14 espèces de légumineuses, (Delobel et Tran, 1993), mais la plante hôte principale est le niébé, *V. unguiculata*. Les adultes mènent une vie libre et se nourrissent principalement de pollen de diverses plantes lorsqu'ils se trouvent dans les agrosystèmes. Il semble qu'ils ne se nourrissent pas lorsqu'ils se développent dans les systèmes de stockage. Les femelles déposent leurs œufs sur les gousses ou les graines de niébé, et les larves néonates pénètrent dans les graines. Tout le développement post-embryonnaire se réalise à l'intérieur des graines. Cette espèce polyvoltine est très féconde et provoque des pertes importantes. Des récoltes entières de graines de niébé peuvent ainsi être détruites après quelques mois de stockage (Caswell, 1961 ; Alzouma, 1981 ; Ouédraogo et al., 1996).



Fig. 7: Femelle de *C. maculatus* sur une graine de niébé (cliché B Jaloux).

D. basalis est un hyménoptère appartenant à la famille des Pteromalidae (Chalcidoidea). Les adultes de cette espèce mènent une vie libre et se nourrissent du nectar de nombreuses plantes. La femelle introduit son ovipositeur dans la graine, atteint la larve de bruche et la pique pour aspirer la goutte d'hémolymphe qui remonte à la surface de la graine. Les larves sont des ectoparasitoïdes solitaires se développant à l'intérieur des graines aux dépens des larves, nymphes et prénymphe de diverses espèces de coléoptères Bruchidae.



Fig. 8: Femelle de *D. basalis* sur une graine de niébé (cliché B Jaloux).

* Conditions d'élevages des insectes

La souche de *C. maculatus* utilisée au cours des expériences a été récoltée en 2000 au Burkina Faso. Au laboratoire, les insectes se développent aux dépens de graines de *V. unguiculata* de la variété Black-Eyes California. Ils sont élevés dans une pièce climatisée programmable où les conditions de photopériode sont de 12 h à la lumière (L) et de 12 h à l'obscurité (D) sous une thermopériode synchrone 33°C-23°C LD. L'humidité relative est de 70 +/-10%. Ces conditions climatiques sont proches de celles observées dans la nature en zone tropicale. Dans ces conditions, la durée du développement est en moyenne de 25 jours (Ouédraogo, 1991). L'élevage en masse est réalisé en introduisant 40-50 couples de *C. maculatus* dans des boîtes rectangulaires de Plexiglass (25 x 10.5 x 17,5 cm) en présence d'environ 300-400 graines de niébé. Après 48 h, les adultes sont retirés et les graines infestées sont isolées jusqu'à ce que les bruches atteignent le stade nymphal (17-18j). Certaines

graines sont alors prélevées et utilisées pour l'élevage de *D. basalis*, les autres sont conservées jusqu'à l'émergence des adultes qui sont utilisés pour les expériences ou pour maintenir l'élevage.

La souche de *D. basalis* utilisée au laboratoire provient de graines de *V. unguiculata* collectées dans des greniers en 2000 au Burkina Faso. Depuis, les différentes générations se sont succédées sur *C. maculatus* se développant dans les graines de niébe. A l'émergence les adultes sont introduits dans une cage d'élevage en Plexiglass (40 x 30 x 30 cm), aérée, mise dans les mêmes conditions d'élevage que les hôtes. Dans les cages, sont introduits des pots contenant de l'eau sucrée et 4 boîtes de Pétri contenant chacune approximativement 150 hôtes renouvelés toutes les 48 heures. Les hôtes présentés sont majoritairement aux stades larve L₄, prénymphe et nymphe, stades qui sont préférentiellement parasités par *D. basalis*, (Nishimura, 1993). Les boîtes de Pétri retirées de la cage d'élevage sont mises dans l'étuve climatisée jusqu'à l'émergence des adultes.

a₂) Insecte urbain : *P. americana* (fig. 9)

** Biologie sommaire de l'insecte*

P. americana est un dictyoptère Blattidae cosmopolite des milieux chauds et humides vivant principalement dans les habitations humaines. Cette espèce s'attaque à tous les produits comestibles ainsi qu'à la colle des reliures de livres. L'adulte mesure de 23 à 32 mm est de couleur brun ferrugineux uniforme avec une tache claire au niveau du pronotum peu marquée. La femelle porte son oothèque, mesurant de 9 à 12 mm, pendant quelques jours puis la dépose sous quelques débris. Le nombre de mues est de 7 et la longévité varie énormément suivant les conditions environnementales.



Fig. 9: Adulte de *P. americana* (www.ifas.ufl).

** Conditions d'élevages de l'insecte*

Les blattes sont élevées au laboratoire de Neurophysiologie d'Angers dans de grandes boîtes de plastiques placées dans des pièces climatisées où les conditions climatiques sont 29°C avec une alternance lumière/obscurité de 12 h / 12 h. Elles sont nourries avec des croquettes destinées à l'alimentation canine. Le cycle entier s'effectue à l'intérieur de ces boîtes en plastiques et les individus sont prélevés en fonctions des besoins des expériences.

a₃) Lépidoptères phytophages inféodés aux plantes productrices de composés secondaires soufrés: *A. assectella* et *P. xylostella* (fig. 10 a-b & fig.11 a-b)

** Biologie sommaire des insectes*

A. assectella est un lépidoptère Acrolepiidae, strictement inféodé aux *Allium* et plus particulièrement au poireau. L'adulte a une envergure de 16 à 18 mm. La tête les antennes, le thorax et l'abdomen sont de couleur brunâtre. Les ailes antérieures sont étroites, rectangulaires, d'un brun grisâtre, parsemées de taches noirâtres et ornées de taches blanches sur le bord inférieur. Les ailes postérieures sont effilées, d'un gris clair et fortement frangées.

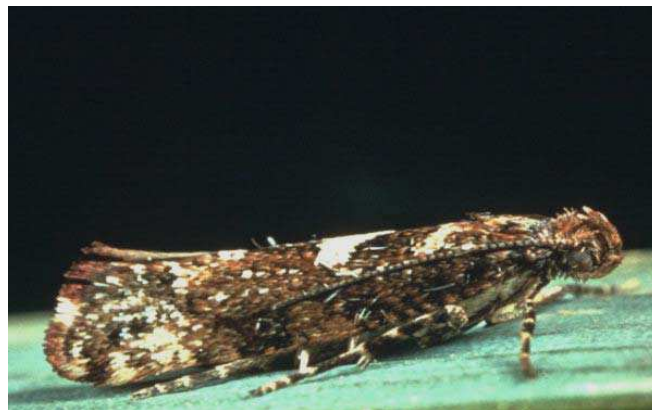


Fig. 10a: Adulte d'*A. assectella*

Les femelles pondent sur les limbes des feuilles de poireau. Après éclosion des œufs, 4 à 8 jours plus tard, les larves néonates rentrent dans le parenchyme foliaire de la plante dans lequel elles vivent en mineuse durant les premiers stades larvaires. Les larves de 5^{ème} stade sortent ensuite du poireau et tissent peu de temps après un

cocon de soie dans lequel elles effectuent leur nymphose qui dure 10 à 20 jours selon les conditions climatiques. L'activité des adultes est essentiellement nocturne ou crépusculaire (Labeyrie, 1956 ; Rahn 1966 ; Thibout, 1978). Le nombre de générations de cette espèce polyvoltine varie de 2 à 8 selon les conditions climatiques (Bonnet, 1976).

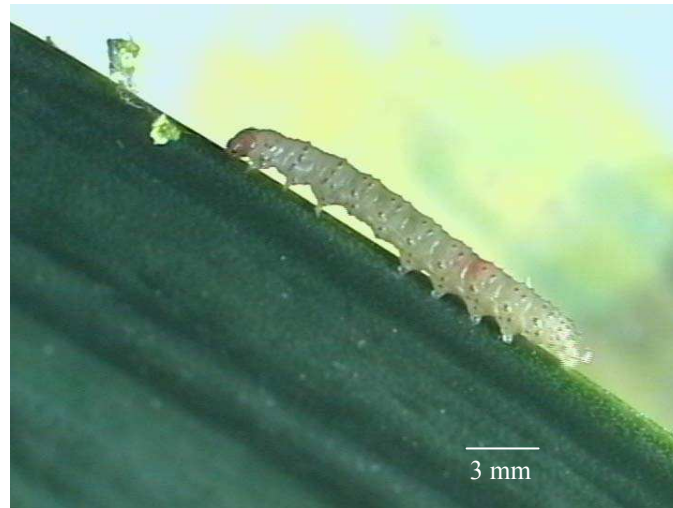


Fig. 10b: Larve mâle d'*A. assectella* (cliché JC Biémont).

La teigne du chou, *P. xylostella* est un lépidoptère Plutellidae strictement inféodé aux plantes de la famille des crucifères. L'adulte mesure 15 mm d'envergure. La tête est rougeâtre, les ailes antérieures sont très allongées, étroites, arrondies à l'extrémité, de couleur jaune brun ponctué de foncé, le bord postérieur est fortement frangé, bordé d'une bande claire, blanchâtre et ondulée. Les ailes postérieures sont beaucoup plus courtes, pointues et longuement frangées, de couleur gris foncé. Au repos, les ailes sont en toit et les antennes projetées en avant.

Le mode de vie de cet insecte ressemble fortement à celui d'*A. assectella*. Les femelles pondent sur les feuilles des crucifères et après éclosion des œufs 4 à 8 jours plus tard, les larves néonates rentrent dans le parenchyme foliaire de la plante dans lequel elles vivent en mineuses durant les tous premiers stades larvaires jusqu'à leur sortie bien avant de tisser leur cocon de soie dans lequel elles effectuent leur nymphose. L'activité des adultes est également nocturne.



Fig. 11a: Adulte de *P. xylostella* (www.intrex.net).



Fig. 11b: Larve de *P. xylostella* (www.intrex.net).

** Conditions d'élevages des insectes*

Les teignes du poireau proviennent d'une souche élevée au laboratoire. Cet élevage est renouvelé tous les ans par des captures d'individus sauvages provenant d'un champ de poireaux cultivés en « agriculture biologique » à la Ville aux Dames (Indre et Loire). Les adultes sont placés dans des boîtes rectangulaires de Plexiglass (24 x 13 x 13cm) dans une salle climatisée où les conditions de photopériode sont de 16h à la lumière (L) et de 8h à l'obscurité (D) sous une thermopériode synchrone 26°C-18°C LD. L'humidité relative est de 70 +/-10%. Le morceau de feuille de poireau introduit dans la boîte, sur lequel les femelles viennent pondre, est renouvelé quotidiennement. Ce morceau de poireau contenant les œufs est alors placé dans une autre boîte rectangulaire dans laquelle sont ajoutées de nouvelles feuilles sur lesquelles se développeront les larves jusqu'au stade nymphal où elles seront récupérées pour redemarrer un nouveau cycle.

La souche de *P. xylostella* a été fournie par le laboratoire de l'INRA d'Antibes. Elle est maintenue et élevée au laboratoire le temps des expériences. L'élevage a alors été développé dans les mêmes conditions que celles utilisées pour l'élevage d'*A. assectella*, les feuilles de chou remplaçant les feuilles de poireau.

a₄) Lépidoptère phytophage polyphage : *A. ipsilon* (fig. 12)

** Biologie sommaire de l'insecte*

A. ipsilon est un lépidoptère Noctuidae polyphage capable de se développer aux dépens d'un très grand nombre d'espèces végétales cultivées qui en fait un ravageur sérieux de nombreuses cultures mais pas du poireau sur lequel elle n'est rencontrée que très occasionnellement. L'adulte mesure 45 mm d'envergure, les ailes antérieures sont de couleur marron avec une zone plus claire sur le quart apical. Chacune porte une tache claire uniforme se prolongeant par un triangle effilé noir. Les ailes postérieures sont de couleur beige très pâle.

Les adultes sont de mœurs nocturnes et les femelles pondent leurs œufs en très grand nombre rarement sur les feuilles d'un végétal mais plutôt dans des endroits humides tel qu'un sol venant d'être travaillé pour les semis. L'émergence des œufs s'effectue environ 4 à 5 jours plus tard et les chenilles rongent alors les feuilles, les pétioles et le collet des plantes pendant la nuit et se dissimulent dans le sol pendant la journée. La croissance larvaire dure de 30 à 60 jours et la nymphose s'effectue dans le sol.



Fig. 12: Larve d'*A. ipsilon* (cliché S Dugravot).

** Conditions d'élevages de l'insecte*

Les adultes sont placés par couples dans des boîtes cylindriques de diamètre de 8,5 cm dans une salle climatisée dans les mêmes conditions que pour les autres lépidoptères. Les parois de ces boîtes sont tapissées par une bande de papier filtre sur laquelle les femelles viennent pondre. Les œufs sont retirés et placés dans des boîtes carrées de 28 cm de côté pour 9 cm de hauteur en présence de feuilles vertes de poireau. Lorsque les larves ont atteint une taille d'environ 1 cm, de la vermiculite est déposée dans le fond de la boîte en réduisant au maximum le nombre d'individus par boîte afin de minimiser les phénomènes de cannibalisme pouvant être très important. Les larves sont alors alimentées abondamment en feuilles vertes de poireau jusqu'à la nymphose.

b) Méthodes expérimentales

b₁) Description de la substance testée

Le composé utilisé, le DMDS ($\text{CH}_3\text{-S-S-CH}_3$), est abondant dans l'environnement des *Allium*. Il est issu de la dégradation du thiosulfinate de diméthyle (DMTi) émis par les *Allium* lors de la lésion des tissus végétaux (Auger et al., 1989) mais est également émis par les fèces des larves d'*A. assectella* par transformation des acides aminés soufrés, par des bactéries présentes dans le tube digestif de ces larves (Thibout et al., 1993). Le DMDS pur est commercialisé par Aldrich et se présente sous forme liquide. Il est extrêmement volatil et son poids moléculaire est de 94 g/mol.

b₂) Mise au point du dispositif expérimental

Des tests de toxicité avec des substances soufrées émises par les *Allium* ont déjà été réalisés précédemment au laboratoire et ont révélé une forte toxicité de ces substances vis-à-vis des espèces d'insectes testés (Thibout et Auger, 1997). Toutefois, il est apparu que le protocole expérimental utilisé ne fournissait pas toujours des résultats répétitifs selon l'expérimentateur. Le cristalliseur de 12 litres a alors été remplacé par des bocaux hermétiques de 1 ou 3 litres de la marque *Le Parfait*. Ces bocaux ont été percés d'un orifice latéral de 2 mm ce qui permet d'introduire le DMDS sous forme liquide avec une micropipette directement à

l'intérieur du bocal sur un morceau de papier filtre *Whatman* de 5 cm de diamètre (fig. 13). L'orifice du bocal est immédiatement bouché hermétiquement. Ce composé étant extrêmement volatil, le liquide diffuse sur le papier et se vaporise à l'intérieur du bocal. Quelques analyses en chromatographie en phase gazeuse ont été réalisées afin de tester l'herméticité des enceintes. Ce nouveau dispositif a permis de limiter au maximum les pertes de produits et ainsi d'effectuer des expériences beaucoup plus répétitives.

Les insectes préalablement introduits à l'intérieur de l'enceinte hermétique sont alors exposés à différentes concentrations de DMDS pendant 24 h et placés dans des étuves bénéficiant de conditions de photopériode, de température et d'humidité identiques aux conditions d'élevages.

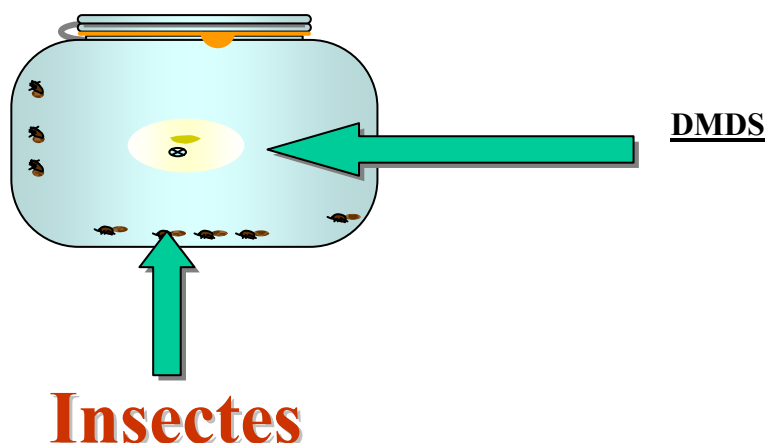


Fig. 13 : Schéma du dispositif expérimental utilisé pour les tests de toxicité.

b₃) Tests de toxicité sur les adultes d'insectes

Les adultes de *C. maculatus* et de *D. basalis* sont âgés de deux jours au début de l'expérience, et les adultes de lépidoptère sont récupérés dès leur émergence. Les adultes de *P. americana* sont d'âge indéterminé et sont les seuls à être nourris dès la fin du traitement. Le nombre d'adultes morts est déterminé 24 à 48 heures après la fin du traitement, ceci pour tenir compte d'un éventuel effet « knock-down ». En effet lorsque l'on analyse leur comportement, on constate qu'à la fin du traitement, la plupart des individus sont retournés sur le dos et effectuent des mouvements

irréguliers des pattes. Au bout de quelques heures à l'air pur, surtout pour les faibles concentrations testées, certains individus vont retrouver leur mobilité, tandis que d'autres meurent après une phase de paralysie plus ou moins longue.

b₄) Tests de toxicité sur les chenilles de lépidoptères

Les méthodes expérimentales utilisées sont les mêmes que celles employées pour les expériences sur les adultes. Les individus testés sont au stade L₅, juste avant la nymphose, stade auquel les chenilles peuvent se passer de nourriture pendant 24 h sans mortalité particulière. Les taux de mortalité sont estimés sur des critères de mobilité et sur leur capacité à effectuer leur nymphose après le traitement, d'autre part.

c) Paramètres estimés

Pour chaque concentration testée, trois ou quatre répétitions (sauf pour *A. ipsilon*) sont effectuées, toujours en présence de 30 ou 40 individus. La concentration létale 50 (CL₅₀) (concentration provoquant 50% de mortalité) est calculée par la méthode des Probits (Finney, 1971) utilisant un programme de maximum de vraisemblance grâce au logiciel MSTAT. Pour chaque répétition un témoin est réalisé, les insectes étant placés dans les mêmes conditions expérimentales mais en absence de DMDS. Les données sont comparées entre elles statistiquement par un test ANOVA suivi d'un test de classement à posteriori (test de domaine multiple de Duncan).

1.3/ Résultats

a) Tests de toxicité sur les insectes des denrées stockées

Les taux de mortalité des adultes des deux espèces augmentent en fonction de la concentration en DMDS (fig. 14). Pour les adultes de *C. maculatus*, le taux de mortalité est inférieur à 10% pour une concentration de DMDS inférieure ou égale à 0,3 µl/l et atteint 100 % pour une concentration supérieure ou égale à 1,1 µl/l. La CL₅₀ est de **0,65 ± 0,01 µl/l**.

Pour les adultes de *D. basalis* le taux de mortalité est inférieur à 10% lorsque la concentration de DMDS est inférieure ou égale à 0,2 µl/l et il atteint 100% quand la concentration est supérieure ou égale à 0,6 µl/l (fig. 14). La CL₅₀ des adultes de *D. basalis* est de $0,31 \pm 0,02$ µl/l.

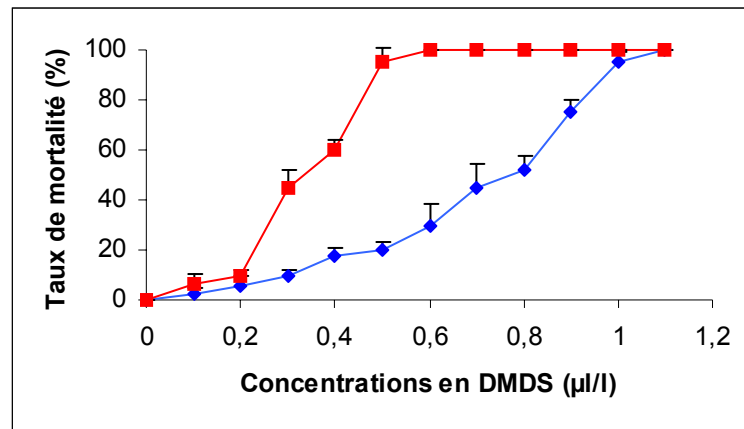


Fig. 14: Taux de mortalité des adultes de *C. maculatus* (carrés) et de *D. basalis* (losanges) exposés à différentes concentrations de DMDS.

Ces résultats montrent donc que les adultes de *D. basalis* sont plus sensibles au DMDS que ceux de *C. maculatus*. Les CL₅₀ sont significativement différentes, celle des adultes de *C. maculatus* étant deux fois plus élevée que celle des adultes de *D. basalis*.

b) Tests de toxicité sur *P. americana*

La sensibilité des adultes de *P. americana* exposés au DMDS est également importante (fig. 15). Des concentrations inférieures à 1 µl/l provoquent des taux de mortalité inférieurs à 20%. Une concentration supérieure ou égale à 1,66 µl/l provoque la mortalité de tous les individus exposés. La CL₅₀ des adultes de *P. americana* est de $1,01 \pm 0,05$ µl/l.

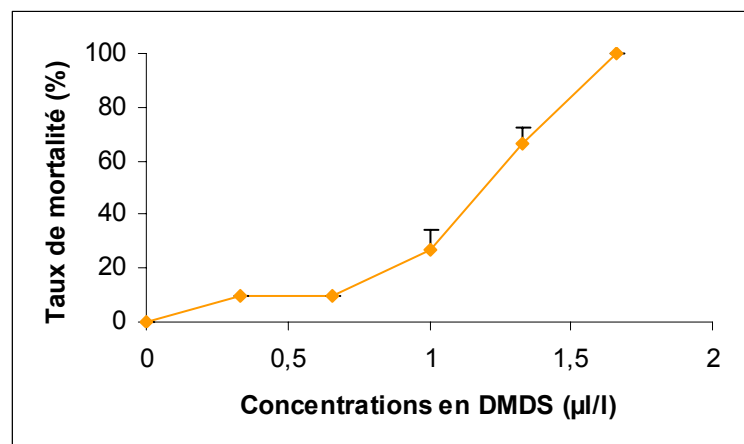


Fig. 15: Taux de mortalité des adultes de *P. americana* exposés à différentes concentrations de DMDS.

c) Tests de toxicité sur les lépidoptères spécialistes des plantes productrices de composés soufrés

Les adultes d'*A. assectella* sont extrêmement sensibles vis-à-vis du DMDS (fig. 16). Une concentration inférieure ou égale à 0,033 $\mu\text{l/l}$ provoque une mortalité inférieure ou égale à 20%. Lorsque la concentration en DMDS est supérieure ou égale à 0,1 $\mu\text{l/l}$ la mortalité est de 100%. La CL_{50} est de $0,04 \pm 0,01 \mu\text{l/l}$.

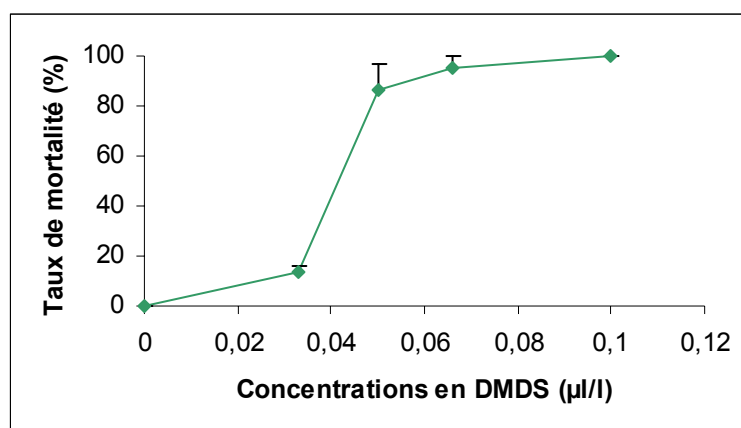


Fig. 16: Taux de mortalité des adultes de *A. assectella* exposés à différentes concentrations de DMDS.

Les adultes de *P. xylostella* sont également extrêmement sensibles vis-à-vis du DMDS (fig. 17). Une concentration de 0,1 $\mu\text{l/l}$ de DMDS suffit pour provoquer la mort de tous les individus testés. La CL_{50} est pareillement de $0,04 \pm 0,01 \mu\text{l/l}$.

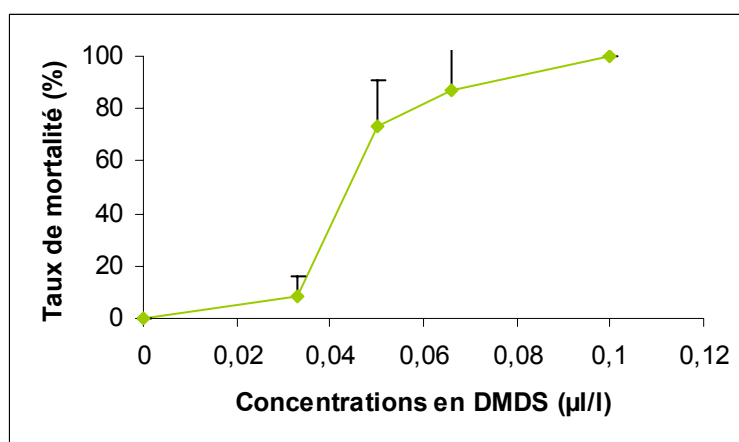


Fig. 17: Taux de mortalité des adultes de *P. xylostella* exposés à différentes concentrations de DMDS.

Les larves d'*A. assectella* sont, par contre nettement moins sensibles que les adultes de la même espèce (fig. 18). Le taux de mortalité est inférieur à 10% lorsque la concentration en DMDS est inférieure ou égale à 1,0 µl/l et des concentrations supérieures ou égales à 8 µl/l sont nécessaires pour provoquer 100% de mortalité. La CL₅₀ est de $3,45 \pm 0,14$ µl/l.

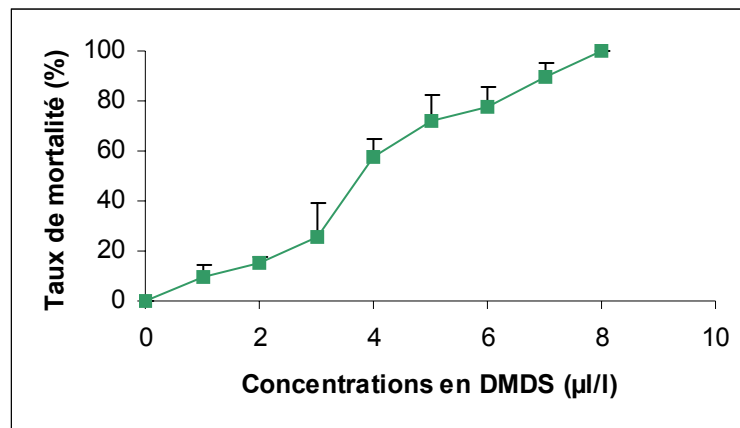


Fig. 18: Taux de mortalité des larves d'*A. assectella* exposées à différentes concentrations de DMDS.

Les larves de *P. xylostella* sont également nettement moins sensibles que les adultes de la même espèce (fig. 19). Le taux de mortalité de ces larves est inférieur à 10% lorsque la concentration en DMDS est inférieure ou égale à 1,0 µl/l. Par contre la concentration nécessaire pour provoquer la mort de tous les individus testés (3,5 µl/l) est moins importante que celle utilisée pour provoquer 100% de mortalité chez les larves d'*A. assectella*. La CL₅₀ est de $2,52 \pm 0,07$ µl/l.

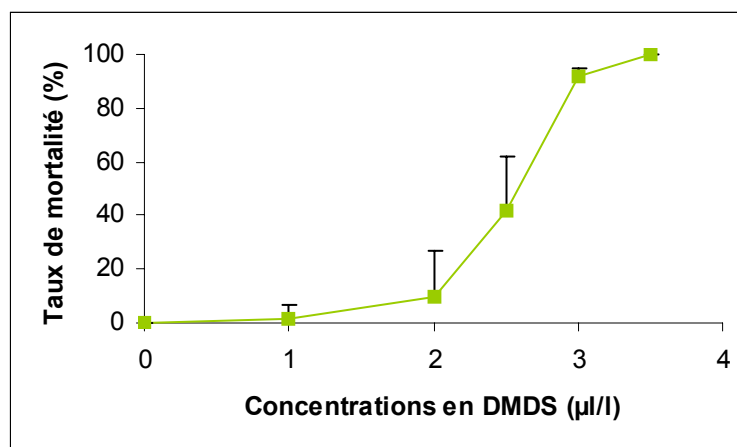


Fig. 19: Taux de mortalité des larves de *P. xylostella* exposées à différentes concentrations de DMDS.

d) Tests de toxicité sur le lépidoptère généraliste

Nous n'avons pu effectuer qu'une seule gamme de concentration pour les larves de *A. ipsilon*. Lors de cette expérience, une concentration de 1 µl/l a entraîné une mortalité inférieure à 50 % alors qu'une concentration de 2 µl/l est suffisante pour provoquer la mort de toutes les larves testées (fig. 20). La CL50 est de **1,08** µl/l.

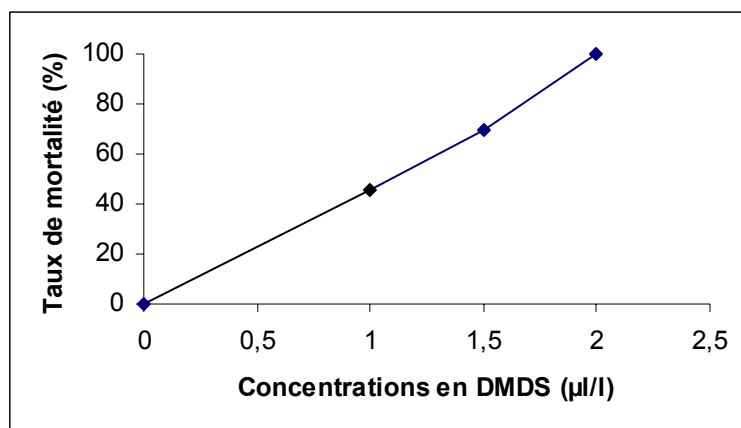


Fig. 20: Taux de mortalité des larves d'*A. ipsilon* exposées à différentes concentrations de DMDS.

1.4/ Discussion

A travers ces quelques expériences, nous avons pu mettre en évidence la forte toxicité du DMDS vis-à-vis des différentes espèces d'insectes testées mais avec des variations de sensibilité entre les espèces (tableau 1).

Individus testés	CL ₅₀ (µl/l) ± SE
<i>C. maculatus</i> (adultes)	0,65 + 0,01c
<i>D. basalis</i> (adultes)	0,31 + 0,02b
<i>P. americana</i> (adultes)	1,01 + 0,05d
<i>A. assectella</i> (adultes)	0,04 + 0,01a
<i>A. assectella</i> (larves)	3,45 + 0,14f
<i>P. xylostella</i> (adultes)	0,04 + 0,01a
<i>P. xylostella</i> (larves)	2,52 + 0,07e
<i>A. ipsilon</i> (larves)	1,08

Tableau 1: Comparaison des CL₅₀ des différents individus par le test de domaine multiple de Duncan. Les valeurs significativement différentes sont indiquées par des lettres différentes.

La bruche, *C. maculatus* et son parasitoïde *D. basalis*, qui sont inféodés à une famille de plantes ne produisant pas de composés soufrés, présentent la plus forte sensibilité. Toutefois, *D. basalis* est deux fois plus sensible que son espèce hôte. De ce fait, l'introduction de substances soufrées ou d'extraits de végétaux émettant des substances soufrées dans les greniers traditionnels de stockage du niébé, lorsque la population de *D. basalis* est importante, pourrait avoir des conséquences néfastes sur le contrôle biologique du ravageur par ce parasitoïde. Ainsi, en atteignant davantage les hyménoptères que les bruchidés, les substances soufrées vont favoriser le développement du ravageur (Dugravot et al., 2002). Boeke et al. (2003) ont également observé que l'application de poudre de *N. tabacum* et *Tephrosia vogelii* dans les greniers traditionnels provoque un impact important sur la population de *D.*

basalis et de ce fait ne réduit pas les déperditions engendrées par *C. maculatus*. Dans le cas où les ennemis naturels ont un fort impact sur les populations de ravageurs, il semble donc très important d'analyser de façon comparative la toxicité d'un traitement vis-à-vis du phytophage et de son entomophage.

La sensibilité de la blatte *P. americana* et celle de la chenille du lépidoptère *A. ipsilon* sont légèrement moins importantes que celles du couple *C. maculatus*/*D. basalis*. *P. americana* et *A. ipsilon* ayant un spectre alimentaire très large ont probablement été amenés à développer des mécanismes leur permettant de digérer et de détoxiquer différentes toxines pouvant être rencontrées dans leur alimentation, ce qui pourrait éventuellement expliquer cette plus faible sensibilité aux composés soufrés. Néanmoins le DMDS reste très toxique vis-à-vis de ces deux espèces.

La sensibilité vis-à-vis du DMDS des lépidoptères spécialistes des plantes productrices de composés soufrés, *A. assectella* et *P. xylostella*, dépend énormément du stade de développement de l'individu.

Les adultes de ces deux espèces sont extrêmement sensibles au DMDS. Cette très forte sensibilité pourrait être due au fait que les adultes de la teigne du poireau et de la teigne du chou ne se nourrissent pas de leur plante hôte. Ainsi, des mécanismes physiologiques coûteux qui auraient pu leur permettre d'échapper à la toxicité de ces composés n'ont donc pas eu besoin d'être sélectionnés. Les adultes de ces deux espèces ont au contraire développé des structures sensorielles capables de détecter d'infimes concentrations de ces substances soufrées dans l'environnement leur permettant la localisation de leur plante hôte (Thibout et al., 1982 ; Lecomte et al., 1987 ; Pivnick et al., 1990 ; 1994). Cette forte sensibilité des adultes de lépidoptère déjà observée précédemment (Auger et Thibout, 2002) pourrait être la conséquence d'importants échanges respiratoires durant le vol, augmentant ainsi la pénétration du composé dans l'organisme.

Par contre, les larves de ces deux espèces sont nettement moins sensibles que les autres espèces testées lors de cette étude. Notons que la sensibilité des larves de ces deux espèces est également moins élevée que celle de stade larvaire de coléoptère ou d'hyménoptère (Auger et Thibout, 2002 ; Dugravot et al., 2002). Les fèces de ces larves de lépidoptère émettent des disulfures dont le DMDS en quantité importante (Auger et al., 1989). Ces larves, en vivant dans leur mine, milieu confiné, sont donc exposées naturellement aux disulfures pendant leur développement. Pour

pouvoir se développer sans mortalité particulière aux dépens de leur plante hôte, les larves de teignes du poireau et de teignes du chou ont donc probablement développé des mécanismes physiologiques, biochimiques ou anatomiques leur permettant de réduire les effets de ces composés allélochimiques soufrés. Ces mécanismes disparaissent ensuite lors de la nymphose, durant laquelle il y a mise en place de nouvelles structures et de nouveaux mécanismes adaptés à la vie imaginale.

D'une manière générale, la toxicité du DMDS est donc très importante vis-à-vis des insectes non inféodés aux plantes productrices de composés soufrés. Cette toxicité du DMDS est même pratiquement équivalente à celle du bromure de méthyle, le fumigant commercial le plus utilisé pour la protection des denrées stockées. Les CL_{50} de *Sitophilus oryzae* exposé au DMDS et au bromure de méthyle dans les mêmes conditions expérimentales sont respectivement de 1,23 $\mu\text{l/l}$ et de 1,05 $\mu\text{l/l}$ (Auger et al., 1999).

Les autres disulfures et thiosulfates émis par les *Allium* possèdent également des propriétés insecticides proches de celles du DMDS (Auger et al., 2002). Toutefois il faut souligner que le disulfure de dipropyle (DPDS) issu principalement du thiosulfate de dipropyle, un des composés soufrés majoritaires du bouquet de volatils émis par le poireau (Jaillais et al., 1999) est nettement moins toxique vis-à-vis de la teigne du poireau que vis-à-vis des espèces non inféodées aux *Allium*. Ainsi, la CL_{50} des larves d'*A. assectella* exposées au DPDS est de 150 $\mu\text{l/l}$ alors qu'elle est égale à 2,6 $\mu\text{l/l}$ chez *C. maculatus* (Auger et Thibout, 2002). Cette différence de sensibilité encore plus importante qu'en présence de DMDS, confirme bien la faible sensibilité des larves de teignes du poireau face aux composés secondaires soufrés des *Allium*.

En plus de ces effets insecticides, certains travaux ont montré que les substances soufrées issues des *Allium* sont toxiques vis-à-vis d'un très large spectre d'organismes : nématodes, acariens (Tada et al., 1988), champignons (Baerlocher et al., 1999) et mammifères (Dugravot et al., 2003).

Les thiosulfates et leurs composés de dégradation, les disulfures, émis par les *Allium* sont donc toxiques vis-à-vis d'un grand nombre d'organismes dans des gammes de concentrations relativement faibles. La toxicité de ces composés allélochimiques soufrés est comparable à celle des isothiocyanates (Dugravot et al., 2002) qui sont également des substances secondaires soufrées mais émises par les

crucifères. Ces composés jouent un rôle considérable dans les systèmes de défenses naturelles de ces plantes (Feeny, 1977 ; Chew et Rodman, 1979 ; Siemens et Mitchell-Olds, 1998) et leur toxicité vis-à-vis des insectes varie également selon que les phytophages sont ou non inféodés à ces plantes (Agrawal, 2000a ; Li et al., 2000).

Il semble donc clair que les thiosulfinates et les disulfures issus des acides aminés non protéiques soufrés des *Allium*, ont un rôle très important dans les processus de défense de ces plantes.

En situation naturelle, les insectes phytophages peuvent se trouver à la fois exposés aux thiosulfinates émis par la plante lors de la consommation des tissus, et aux thiosulfinates et disulfures émis lors de la digestion des fragments de végétaux dans le tube digestif aboutissant à la fuite ou la mort des organismes consommateurs. Ainsi par la suite, des comportements d'évitement de ces végétaux ont été sélectionnés chez les herbivores n'ayant pas développé d'adaptation à ces substances soufrées. De ce fait, ces systèmes de défense chimique s'expriment plutôt par le biais de phénomènes de répulsion ou d'anti-appétence des insectes phytophages non spécialistes des *Allium* comme cela a été observé chez *Ephesia kuehniella* en présence de thiosulfinate de dipropyle (DPTi), (Auger et al., 1989). De même, chez les crucifères, les glucosinolates et leur produits de dégradation, les isothiocyanates sont répulsifs vis-à-vis d'un très large spectre d'insectes non inféodés à ces plantes (Chew, 1988).

Les composés secondaires soufrés des *Allium* interviennent donc sans aucun doute dans les processus de défenses naturelles de ces plantes et semblent donc être responsables du très faible nombre d'espèces d'insectes phytophages capables de se développer à leurs dépens.

Nous allons maintenant dans le chapitre suivant, tenter d'expliquer comment ces substances soufrées peuvent provoquer la mort des organismes qui y sont confrontés.

CHAPITRE 2 :

MODE D'ACTION DES SUBSTANCES SOUFREES DES *ALLIUM* SUR LES INSECTES

2.1/ Introduction

Il a été mis en évidence lors du chapitre précédent que les composés secondaires soufrés produits par les *Allium* interviennent dans les réactions de défenses de ces plantes en milieu naturel, très probablement par des phénomènes de répulsion ou d'anti-appétence vis-à-vis d'un grand nombre d'espèces d'insectes phytophages. Toutefois, lors des expériences réalisées en atmosphère confinée, et donc à des concentrations supérieures à celles qui se trouvent dans l'environnement des *Allium*, il apparaît que ces substances soufrées et notamment le DMDS possèdent des activités insecticides très importantes vis-à-vis des espèces non inféodées à ces plantes comme cela avait déjà été démontré il y a quelques années (Auger et al., 1994 ; 1999).

Cependant, le mode d'action par lequel ces substances soufrées et notamment le DMDS provoquent la mort des organismes confrontés à ces composés demeurerait jusqu'à maintenant inconnu. Nous allons donc tenter dans ce chapitre de caractériser précisément le mode d'action du DMDS sur la physiologie et le métabolisme des insectes. La caractérisation du mode d'action des composés soufrés a bien évidemment un intérêt fondamental pour comprendre comment les défenses soufrées des *Allium* peuvent potentiellement s'exprimer, mais la compréhension des processus provoquant la mort des organismes confrontés à de telles substances, peut également s'avérer très intéressante d'un point de vue plus appliqué. En effet, étant donné la forte toxicité de ces substances soufrées en atmosphère confinée vis-à-vis des insectes, leur emploi en fumigation pour la protection des denrées stockées semble envisageable (Auger et al., 1994 ; 1999). A l'heure actuelle, le fumigant le plus utilisé pour la protection des denrées stockées tels les grains entreposés dans les silos, est le bromure de méthyle. Cependant malgré son efficacité vis-à-vis des œufs, des stades larvaires et adultes d'insectes, ce composé présente le désavantage d'être particulièrement destructeur de la couche d'ozone (Watson, 1992). Ainsi, l'interdiction de son utilisation est programmée pour 2005 dans les pays industrialisés et 2015 pour les pays en voie de développement (Bell, 2000 ; Taylor, 1996). La recherche de substances de substitution au bromure de méthyle devient donc impérative et les substances végétales aux propriétés insecticides représenteraient alors une voie alternative très intéressante pour la protection des récoltes (Carlini et Grossi-de-Sa, 2002). Dans ce contexte, la caractérisation du mode d'action du DMDS et l'étude de sa toxicité sur les mammifères pourraient

nous éclairer sur la potentialité d'utilisation des substances soufrées des *Allium* en fumigation.

Nous allons donc tout d'abord dans ce chapitre, déterminer la sensibilité d'un mammifère, la souris *Mus musculus* vis-à-vis du DMDS afin de comparer cette sensibilité à celles des différentes espèces d'insectes testées au chapitre précédent. Puis nous rechercherons les cibles éventuelles du DMDS sur le système nerveux central de la blatte *Periplaneta americana* connue pour être un modèle très intéressant pour la caractérisation des effets des molécules insecticides sur le système nerveux des insectes (Pelhate et al., 1990 ; Buckingham et al., 1997 ; Lapied et al., 2001). Enfin des expériences complémentaires utilisant des techniques d'oxymétrie et de spectrophotométrie permettront de rechercher les effets du DMDS sur le métabolisme énergétique des organismes.

L'ensemble de ce travail est issu d'une collaboration avec l'équipe du Professeur Bruno Lapied du Laboratoire de Neurophysiologie d'Angers et avec le Professeur David Macherel du Laboratoire de Physiologie Moléculaire des Semences d'Angers. En raison de l'approche multidisciplinaire et des différentes contributions des co-auteurs, la partie « matériels et méthodes » et « résultats » de ce travail sera présenté tel qu'il a été publié (S. Dugravot, F. Grolleau, D. Macherel, A. Rochetaing, B. Hue, M. Stankiewicz, J. Huignard & B. Lapied, 2003. Dimethyl disulfide exerts insecticidal neurotoxicity through mitochondrial dysfunction and activation of insect K_{ATP} channels. J. Neurophysiol. 90: 259-270).

2.2/ Matériels et Méthodes

a) Susceptibility of adult mice to DMDS.

Male Swiss mice weighting 35 ± 5 g were used for this study. All procedures were performed in accordance with the regulations of the French ministry of Agriculture, for the care and use of laboratory animals. The determination of the LC_{50} of the mice population exposed to DMDS was performed as followed. Each increasing concentration of DMDS, between 1 and 10 μ l/l air, was tested on a 30-mice group subdivided into 6 subgroups of 5 mice. A 30-mice control group was only exposed to confined air. After 24-hours exposure, the number of dead mice was

noted and the results were expressed as percentages in relation to the different concentrations used. During exposure to DMDS, each mice subgroup was placed in a 40-l experimental chamber during 24 h. At first, mice were placed in a small transparent box with water and food. Then, each box perforated on two sides was heightened in an experimental chamber to inhibit all CO₂ effects. In fact, CO₂ and H₂O were respectively captured with potassium hydroxide and calcium dichloride. The temperature was controlled and maintained to $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Just before airtight closing the chamber, DMDS was quickly applied, on an absorbent paper (Whatman paper) placed above a glass pot, for a swift and complete spraying of product.

b) Electrophysiology

b₁) Synaptic transmission – single fiber oil-gap recordings

All experiments were performed on adult male cockroaches, *P. americana*. Briefly, the single fiber oil-gap technique (Hue et Callec, 1990) was used to record composite excitatory postsynaptic potentials (cEPSPs) in response to electrical presynaptic stimulation applied at a frequency of 0.1 Hz to the ipsilateral cercal nerve. Direct activation of cholinergic postsynaptic receptors located on dendritic membranes of the isolated giant interneuron (GI) was achieved by means of ionophoretic micro-injection of carbamylcholine (CCh) within the neuropile of the terminal abdominal ganglion (TAG). To assess the physiological properties of the axonal membrane, action potentials were evoked in the intraganglionic part of the TAG by passing suprathreshold square current pulses using a wheastone bridge circuit. During the experiments, resting potential and unitary EPSPs were continuously monitored on a pen chart recorder. The cEPSPs were recorded as the average on three sweeps. The desheathed TAG was superfused with a saline of the following composition (in mM): 208 NaCl, 3.1 KCl, 10 CaCl₂, 2 NaHCO₃, and 26 sucrose, pH 7.4. DMDS (100 μM) was bath-applied directly onto the TAG during periods of 30-60 min. Quantitative effects of DMDS were expressed as mean \pm SE ($n = 3$).

b₂) Isolated DUM neurons (fig. 21) - Whole cell patch-clamp recordings

Experiments were performed on dorsal unpaired median (DUM) neuron cell bodies isolated from the midline of the TAG of the nerve cord of adult male cockroaches P. americana, as previously described (Lapied et al., 1989). DUM neuron cell bodies used were maintained at 29°C for 24 h before electrophysiological experiments were carried out. The whole cell patch-clamp recording configuration was used to record ionic currents (voltage-clamp mode) and action potentials (current-clamp mode). Signals were recorded using an Axopatch 200A amplifier (Axon Instruments Inc. Foster City, CA). Patch pipettes were pulled from borosilicate glass capillary tubes (Clark Electromedical Instruments, Harvard Apparatus, Edenbridge, UK) with a PP-83 electrode puller (Narishige, Japan) and had resistances of 0.9 – 1.3 MΩ when filled with the pipette solution (see composition below). The liquid junction potential between bath and internal pipette solution was compensated before the formation of a gigaohm seal (>3 GΩ).

For current-clamp experiments, depolarizing current pulses were elicited at 0.5 Hz with a programmable stimulator (SMP 310, Biologic, Claix, France). Evoked action potentials and membrane potential were displayed and stored on the hard disk of an IBM pentium 100 computer with the pClamp software control (pClamp version 6.03, Axon Instruments). The computer was connected to a 125 KHz labmaster DMA data acquisition system (TL-1-125 interface, Axon Instruments). The bathing solution contained (in mM) 200 NaCl, 3.1 KCl, 5 CaCl₂, 4 MgCl₂, 10 HEPES buffer, and the pH was adjusted to 7.4 with NaOH. The recording electrode was filled with (in mM) 150 K-aspartate, 10 KF, 10 NaCl, 1 MgCl₂, 3 ATP-Mg, 0.5 CaCl₂, 10 EGTA, 10 HEPES buffer, pH 7.4. For voltage-clamp studies of the inward sodium current, step voltage pulses were generated by the computer using pClamp software. Cells were clamped at a holding potential of – 90 mV and test pulses of 30 ms in duration were applied at 0.3 Hz. The procedure used to record the DUM neuron inward sodium currents was described in detail elsewhere (Lapied et al., 1990 ; 2001).

In all electrophysiological studies, DMDS stock solution (100 mM) was prepared in dimethylsulphoxide (DMSO). Final dilution contained at most 0.1 % DMSO. These concentrations of solvent were found to be without effect on both axonal and electrophysiological properties. All compounds were purchased from

Sigma Chemicals (L'isle d'Abeau Chesnes, France). Experiments were carried out at room temperature (21°C). Data were expressed as mean \pm SE when quantified.



Fig. 21: Corps cellulaire de DUM neurone isolé (cliché B Lapiéd).

c) Effect of DMDS on cellular respiration

c₁) *Drosophila melanogaster* S2 cell line

The S2 cell was cultured in Shields and Sang M3 insect medium. For respiratory measurements, cells in the exponential phase of growth were collected with culture medium, concentrated by centrifugation (1000 rpm) and finally suspended in a small volume of medium and kept on ice until experiment. Oxygen consumption was monitored with an oxygen electrode (Oxytherm, Hansatech, King's Lynn, UK) at 30 °C in 1 ml of culture medium. Cells (100 μl; 6.8×10^6 cells) were added to the reaction chamber previously equilibrated with 0.9 ml of culture medium. Inhibitors were added as required and indicated in the corresponding figures and legends.

c₂) Isolated plant mitochondria

*Mitochondria were isolated from 22h imbibed pea (*Pisum sativum* L.) seeds and purified using Percoll (Amersham Pharmacia Biotech) gradients using general method for plant mitochondria (Douce et al., 1987). The mitochondria were highly purified according to marker enzyme analysis for cytosol, plastid, peroxysome and*

electron microscopy (results not shown). Oxygen consumption was monitored with the oxygen electrode at 25 °C in 1 ml of reaction medium containing 0.6 M mannitol, 20 mM MOPS pH 7.5, 10 mM KH_2PO_4 , 10 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , and 0.1 % (wt/vol) BSA. Mitochondria, substrates, cofactors and inhibitors were added as required and indicated in the corresponding figures and legends. The analysis of electron transfer from exogenous NADH to cytochrome c was followed spectrophotometrically with a microplate reader (Spectramax plus, Molecular devices). Reactions were carried out at 25 °C in a volume of 250 μl of reaction medium supplemented with 0.04 % Triton X100 (vol/vol), 1 mM KCN, 80 μM horse cytochrome c (Sigma) and mitochondria (0.8 mg protein/ml). The reaction was initiated by the addition of 2 mM NADH, and reduction of cytochrome c was followed through its absorbance at 550 nm. A cytochrome oxidase assay based on a classical protocol (Trounce et al., 1996) was adapted to the microplate format that allows the simultaneous recording of multiple absorbance and spectrum. The reaction mixture (270 μl) contained 50 μM MOPS, pH 7.4, 0.05 % (vol/vol) triton X100, 40 μM reduced cytochrome c (stock solution reduced by a crystal of sodium dithionite) and mitochondria (15 μg protein/ml). The reaction was incubated at 25 °C inside the microplate reader and absorbance at 550 nm was recorded every 5 s. After 3 min of reaction, cytochrome c spectra were recorded simultaneously on all samples. Protein concentrations were determined by Bradford bioassay (Biorad, UK) using BSA as a standard.

2.3/ Results

a) Susceptibility of mice to DMDS

It was shown previously that DMDS was toxic against insect species (chapitre 1), we performed experiments to determine if mammals were also susceptible to DMDS vapors. Figure 22 illustrates that all adult mice were dead when they were exposed to DMDS doses ranging from 5 to 10 $\mu\text{l/l}$ air. The mice were not killed for lower doses (from 0.1 to 1 $\mu\text{l/l}$ air). For concentrations ranging from 1.5 $\mu\text{l/l}$ to 1.9 $\mu\text{l/l}$ air (in 0.1 $\mu\text{l/l}$ concentration increment), the rate of mortality was strongly increased from 43.5 ± 2.0 % to 78.6 ± 1.7 %, respectively. The 24-h LC_{50} value was

estimated at 1.5 $\mu\text{l/l}$ air and a concentration of 5 $\mu\text{l/l}$ air DMDS was needed to achieve 100 % kill.

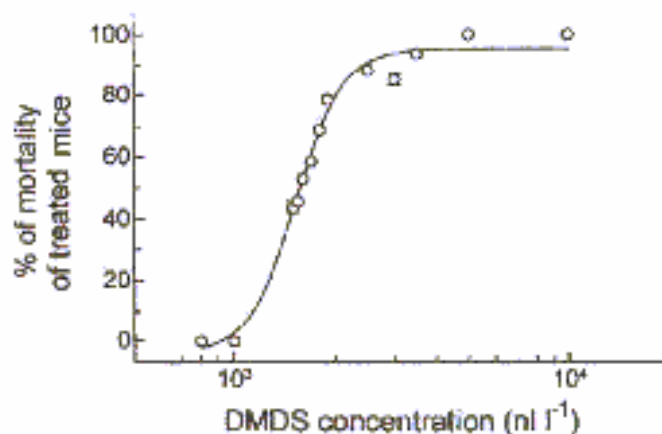


Fig. 22: Taux de mortalité de la souris, *M. musculus* exposée à différentes concentrations de DMDS.

Because DMDS exhibited highest bioactivity against insect, we examined further the effectiveness of DMDS on the insect central nervous system (CNS) as a potent insect neurotoxic agent.

b) Effects of DMDS on the cockroach CNS

Because one of the most attractive aspect of using DMDS is its ability to exhibit insecticide toxicity, we performed new series of experiments on cockroach CNS to obtain more insight into its insecticide mode of action. As already indicated above, the cockroach CNS possesses a number of interesting features which make it suitable for studying neurotoxicity of insecticides. The neurotoxic effect of DMDS were studied on three distinct preparations including 1) isolated giant axon (Pelhate et al., 1990), 2) cercal afferent/giant interneuron synapses in the terminal abdominal ganglion (Hue and Callec, 1990) and 3) short-term cultured neurosecretory cells identified as DUM neurons (Grolleau and Lapied, 2000; Wicher et al., 2001).

b₁) Effects of DMDS on isolated axon

Both action potentials and ionic currents (i.e inward sodium and outward potassium currents), recorded under current- and voltage-clamp conditions, respectively (Pelhate et al., 1990) were not affected at 100 μ M DMDS (data not shown). This indicated that the voltage-dependant ionic channels underlying cockroach axonal electrical activity could not be proposed as responsible for the toxic effect of DMDS.

Consequently, we wanted to determine wheter DMDS could affect synaptic transmission between sensory fibers which originate from the machanoreceptors of the cerci and Gis (Hue et Callec, 1990).

b₂) Effects of DMDS on synaptic transmission

Previous findings have reported that the electrical stimulation delivered on cercal nerve XI evokes composite excitatory postsynaptic potentials (cEPSP) mainly due to the activation of postsynaptic nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) (Hue and Callec, 1990).

In this study, the superfusion of the experimental chamber with saline containing DMDS (100 μ M) induced postsynaptic depolarization (about 5mV, not shown) together with a gradual decrease (15% and 90% within a period time of 10-60 min, respectively) of both cEPSP (fig 23A, a and b) and random unitary EPSPs (fig. 23B, a and b). The synaptic transmission did not recover after DMDS application. Although it was not possible to obtain a subthreshold cEPSP by increasing the presynaptic cercal nerve stimulation during DMDS treatment, ionophoretic microapplication (300 ms in duration, 300 μ A) of CCh could evoke postsynaptic potential with an amplitude very similar to that of recorded in control (fig. 23C, a and b). It is interesting to mention that the DMDS effects were mimicked by 10 μ M 2,4-dinitrophenol (2,4-DNP, a non specific mitochondrial uncoupler, data not shown). There results suggested that postsynaptic AchRs located on the GI dendritic tree cannot be considered as a synaptic target for DMDS molecules. By contrast, these experiments led us to conclude that DMDS could interfere with presynaptic processes depending on ATP known to be involved in synthesis and/or release of the neurotransmitter as previously demonstrated with threonine-6-bradykinin (Hue and Piek, 1989). Finally, the lack of effects of 100 μ M DMDS (fig.

23D, a and b) observed on action potential elicited in the GI axonal membrane by passing depolarizing square current pulse (5 ms in duration, 8nA in amplitude) confirmed the results obtained in both current- and voltage-clamp conditions on isolated giant axon. From these results, it is tempting to suggest, among other possibilities, that the alteration of the neurotransmitter release depending on intracellular ATP observed at presynaptic level might reflect an alteration in the oxidative phosphorylation process induced by DMDS.

To substantiate this hypothesis, isolated short-term cultured DUM neurones were used to facilitate the study of the neurotoxic effect of DMDS on the electrophysiological properties of individual cell (fig. 24).

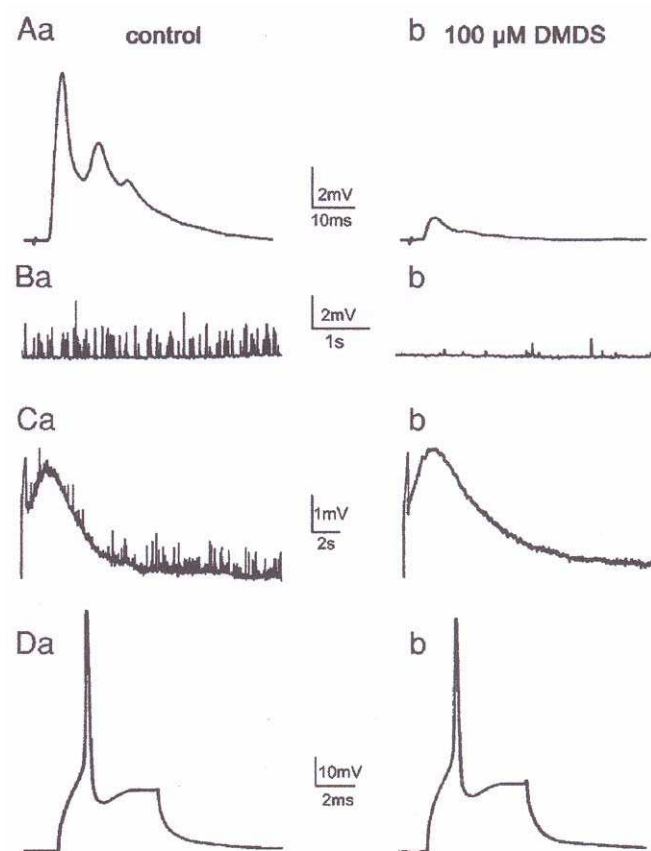


Fig. 23: Effet du DMDS sur la transmission synaptique cholinergique entre le nerf cercal et les interneurones géants de *P. americana*.

A: le seuil d'excitation du potentiel postsynaptique excitateur (PPSEc) déclenché par une stimulation électrique présynaptique (**Aa**) est réduit de façon irréversible par l'application de 100 μ M de DMDS (**Ab**). **B:** l'amplitude du PPSE unitaire est également fortement réduite après un traitement au DMDS (**Bb**) comparé au control (**Ba**).

A l'inverse, le potentiel postsynaptique déclenché par une microapplication ionophorétique (300 ms, 300 μ A) de carbamylcholine (CCh) (**Ca**) n'est pas affecté par la perfusion de DMDS (**Cb**). Des résultats similaires ont été observés sur le potentiel d'action (**D,a et b**) d'axone d'interneurone géant (GI) obtenu suite à l'application d'un créneau dépolarisant de 5 ms (8 nA en amplitude) et en présence de 100 μ M de DMDS.

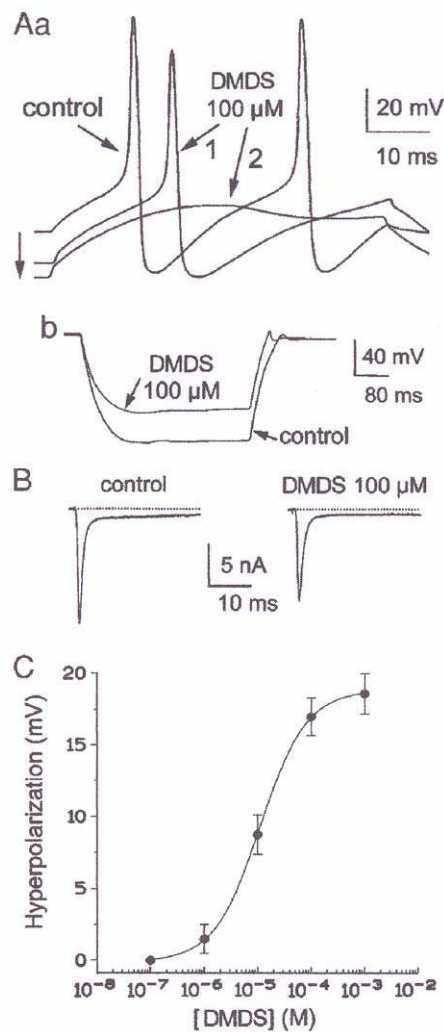


Fig. 24: Action du DMDS sur les propriétés électrophysiologiques d'un DUM neurone isolé enregistrées par la technique du patch-clamp en configuration cellule entière.

Aa: Superposition des potentiels d'action enregistrés sur un corps cellulaire isolé maintenu à -51 mV avant (control), et suite à l'application de $100 \mu\text{M}$ de DMDS pendant 10 min (1) et 16 min (2) (créneau de courant dépolarisant : $0,7$ nA). La flèche verticale indique l'hyperpolarisation importante observée après l'application de DMDS.

Ab: réduction de la résistance membranaire induite par le DMDS étudiée en réponse à l'application d'un courant hyperpolarisant de 400ms.

B: tracé du courant sodium entrant obtenu par un créneau dépolarisant de -90 mV à 0 mV pendant 30 ms, en absence (control) et en présence de $100 \mu\text{M}$ de DMDS.

C: courbe dose-réponse semi-logarithmique de l'hyperpolarisation membranaire induite par le DMDS. La courbe représente l'ajustement des moyennes selon l'équation de Hill ($r = 0.998$).

Les données sont des valeurs moyennes \pm SE.

b₃) Effets of DMDS on the electrophysiological properties of DUM neurones

The somata of DUM neurons generate overshooting sodium-dependent action potentials and are characterized by a membrane potential depending on the external concentration of both sodium and potassium (Grolleau and Lapied, 2000).

When isolated DUM neuron cell body was superfused with 100 μ M DMDS, two distinct effects depending on time of application were observed. As illustrated in fig. 24Aa, the amplitude of the action potentials, triggered by a depolarizing current pulse (0.7 nA, 50 ms in duration) slightly decreased 10 minutes after applying 100 μ M DMDS. This effect was associated with a hyperpolarization of the membrane potential (23.6 ± 2.8 mV, $n = 6$) obtained 16 minutes after DMDS treatment (fig. 24Aa).

Because it is known that the sodium inward current is responsible for the depolarizing phase of action potentials (Lapied et al., 1990), we tested DMDS (100 μ M) on the inward sodium current under voltage-clamp condition (fig. 24B). As expected from current-clamp experiments, the amplitude of the inward sodium current elicited by a 30-ms depolarizing pulse to 0 mV from a holding potential of -90 mV was also reduced (21.7 ± 2.4 %, $n = 7$). This effect correlated well with the reduction of the action potential amplitude.

To ensure that the hyperpolarization observed was due to an activation or an inhibition of the resting conductances (Grolleau and Lapied 2000), we tested the effect of DMDS on the DUM neuron input resistance. As shown in fig. 24Ab, 100 μ M DMDS produced a decrease in the input resistance (by 32 ± 4 %, $n = 6$) in response to a hyperpolarizing current pulse (400 ms in duration). This indicated that the hyperpolarization was due to the activation of a hyperpolarizing conductance and not to the loss of a depolarizing resting conductance (Grolleau and Lapied 2000).

In other words, the activation of potassium channels involved in the maintenance of the membrane potential could accounted for the membrane hyperpolarization observed in the presence of DMDS. Because this last effect represents a unusual neurotoxic effect for such compounds exhibiting insecticide activity, the remaining part of this study will mainly be focused on the mode of action of DMDS on the membrane potential.

To express more quantitatively the effect of DMDS on the membrane potential, isolated DUM neuron cell bodies were exposed to various concentrations of DMDS

(fig. 24C). Mean values of hyperpolarization were plotted against the logarithm of the non-cumulative concentration of DMDS. The threshold concentration inducing hyperpolarization was about 500 nM and this hyperpolarization became more important with increasing DMDS concentration (fig. 24C). The sigmoid curve corresponded to the best fit (correlation coefficient $r = 0.998$) according to the Hill equation. The EC_{50} value estimated for DMDS (i.e., the concentration of DMDS that produces 50 % increase of the hyperpolarization) was 8.7 μ M. For comparison, the corresponding hyperpolarization was obtained at a concentration of 1 mM.

As indicated above, because it appeared that the potassium channels could be suspected to be involved in the hyperpolarization produced by DMDS, different potassium channel blockers were tested (fig. 25A). We first examined the effect of the most commonly used blocker, TEA-Cl, known to inhibit potassium channels in DUM neurons (Grolleau and Lapied, 2000). As illustrated in fig. 25A, TEA-Cl (5 mM) was a weak inhibitor of the hyperpolarization observed after application of 100 μ M DMDS. Similar effects were obtained with higher TEA-Cl concentrations (i.e., 10 mM, data not shown). By contrast, sulfonylurea drugs glibenclamide and tolbutamide, known to block ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channels (Inagaki et al., 1996) strongly reduced the effect of DMDS. As indicated in Fig. 25A, bath application of DMDS in the presence of 100 μ M glibenclamide and 100 μ M tolbutamide only induced a small hyperpolarization (17.5 ± 2.3 % and 12.4 ± 4.5 %, $n = 4$, respectively) compared to control (100 %). This suggested that K_{ATP} channels could be involved in the hyperpolarization induced by DMDS.

The following experiments were designed to reinforce this hypothesis. In all the DUM neuron tested, glibenclamide (100 μ M) alone caused an important depolarization (more than 25 mV), suggesting that these K_{ATP} channels were activated under resting condition and contributed to the membrane potential of DUM neurons. Interestingly, under this experimental condition, DMDS only produced a small conductance change (i.e., 2-4 mV of hyperpolarization, fig. 25B). As illustrated in the inset of fig. 25B, the decrease in input resistance provoked by 100 μ M DMDS (see fig. 24Ab) can be counteracted by glibenclamide (100 μ M).

Finally, for comparison, it should be noted that 100 μ M diazoxide, a well-known K_{ATP} channels opener (Ashcroft and Gribble, 2000), induced a similar DUM neurone hyperpolarization to that of DMDS (fig. 25A).

Because K_{ATP} channels are closed for high concentration of cytoplasmic ATP and are open when the ATP concentration decreases below a threshold (e.g.,

Ashcroft and Gribble, 1998), DUM neuron K_{ATP} channels can also be identified by their sensitivity to various intracellular ATP concentrations.

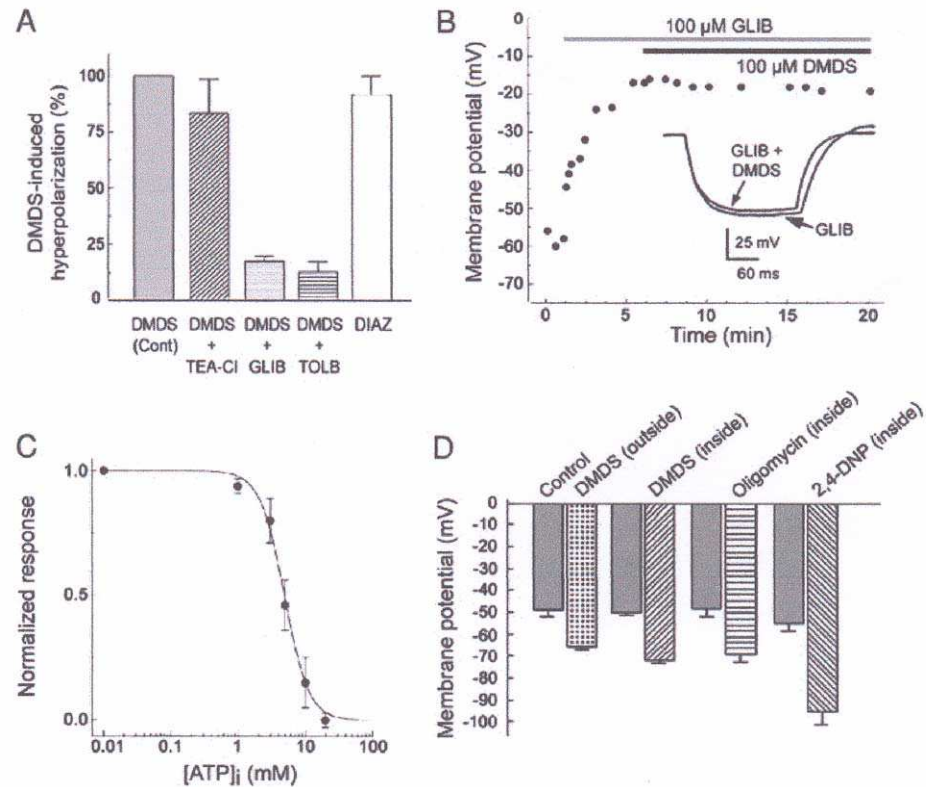


Fig. 25: Activation des canaux K_{ATP} dans les corps cellulaires de DUM neurones par le DMDS.

A: Pourcentages moyens d'hyperpolarisation induite par le DMDS enregistrés avant (control) et en présence de 5 mM de TEA-Cl (Bloqueur de canaux potassium non selectif), 100 μ M de glibenclamide (GLIB), et 100 μ M de tolbutamide (TOLB) ; GLIB et TOLB sont des bloqueurs spécifiques des canaux K_{ATP} . En comparaison, le diazoxide (DIAZ 100 μ M), ouvreur des canaux K_{ATP} a également été testé. Le diazoxide induit une hyperpolarisation similaire à celle induite par le DMDS.

B: Dépolarisation membranaire induite au cours du temps par 100 μ M de GLIB. L'effet de 100 μ M de DMDS sur le potentiel de membrane est abolit en présence de 100 μ M de GLIB. *Encart:* Potentiel de membrane enregistré en réponse à un créneau de courant hyperpolarisant (150 ms) en présence de 100 μ M de GLIB associé ou non à 100 μ M de DMDS.

C: Etude de la sensibilité à l'ATP (appliqué à différentes concentrations dans la pipette de patch) des canaux K_{ATP} des DUM neurones en présence de 100 μ M de DMDS. Le graphique représente la courbe concentration-réponse de l'inhibition des effets du DMDS par l'ATP. A forte concentration l'ATP (>10 mM) inhibe les effets induits par le DMDS.

D: Effets du DMDS suite à une perfusion extracellulaire ou intracellulaire via la pipette de patch. Les effets observés sur le potentiel de membrane sont comparables à ceux induits par l'application intracellulaire de 100 μ M d'oligomycine (Inhibiteur de l'ATPase mitochondriale) et de 100 μ M de 2,4-DNP (agent découplant mitochondrial non spécifique). Les données sont des moyennes \pm SE.

Using the conventional whole-cell recording configuration, we examined the DMDS sensitivity of the DUM neuron K_{ATP} channels by combining incubation of isolated cell bodies with 100 μ M DMDS with dialysis of different ATP concentration pipette solutions. After 4 minutes of dialysis, stable DMDS-induced hyperpolarizations were obtained depending on the ATP concentration pipette solutions. Fig. 25C shows the corresponding construction of the ATP-dose inhibition curve. The DMDS-induced hyperpolarization almost was fully inhibited by internal ATP concentrations above 10 mM and was approximately one-half maximal at 5 mM. At low ATP concentration (10 μ M), the effect of DMDS on the membrane potential was maximum. The apparent IC_{50} for DMDS-induced hyperpolarization inhibition by internal ATP was 5.6 mM, according to the Hill equation (correlation coefficient $r = 0.999$).

It is well known in the literature that K_{ATP} channels are an important class of ionic channels, linking bioenergetic metabolism to membrane excitability. Furthermore, K_{ATP} channels were sometimes associated with metabolic dysfunction since they were opened or closed in response to decrease and increase internal ATP concentrations, respectively. Consequently, intracellular factors such as mitochondrial dysfunction are believed to play an important role in the alteration of the K_{ATP} channels activity. In our context, it was tempting to suggest that the DUM neuron K_{ATP} channels might be one the targets acting as direct functional response element to DMDS-induced mitochondrial dysfunction, which thereby produced changes in intracellular ATP concentration.

To substantiate this hypothesis, we first applied DMDS intracellularly (i.e., through the intrapipette solution) or extracellularly (i.e., through the bathing solution superfusing the DUM neuron cell body). In both cases, (fig. 25D), DMDS (100 μ M) induced an important hyperpolarization of the membrane potential (from -50.2 ± 1.2 ($n = 5$) to -71.9 ± 1.1 ($n = 7$) and from -49.3 ± 2.8 ($n = 5$) to -65.8 ± 1.5 ($n = 6$), respectively). These results indicated that DMDS could cross the membrane to exert its neurotoxic effect on the K_{ATP} channels. Then we compared the effect of DMDS to oligomycin (100 μ M, a mitochondrial ATPase inhibitor) and 2,4-DNP (100 μ M), which were introduced into the cell body by diffusion through the patch pipette. Fig. 25D illustrates that both compounds were capable of producing a hyperpolarization of the membrane potential (from -48.3 ± 3.8 ($n = 5$) to -68.6 ± 3.5 ($n = 5$) and from -55.2 ± 3.5 ($n = 5$) to -95.4 ± 5.6 ($n = 6$), respectively). They also indicated that a decrease in intracellular ATP concentration, following

mitochondrial dysfunction, could activate DUM neuron K_{ATP} channels. It should be noted that we never observed any effect of bath applied DMDS using oligomycin in the patch pipette (data not shown).

Together these results seemed to indicate that DMDS could indirectly activate K_{ATP} channels, leading to a hyperpolarization, via an inhibition of mitochondrial respiration which thereby decreased intracellular ATP concentration. To further understand this unusual neurotoxic mechanisms, we decided to examine further the effect of DMDS on the different mitochondrial respiratory chain complexes.

c) Effects of DMDS on the cellular respiration

c₁) Effect of DMDS on *D. melanogaster* S2 cells

The effect of DMDS on animal cellular respiration was first investigated with cultured *D. melanogaster* S2 cells (Towers and Satelle, 2002), which gave us higher cell density that isolated DUM neurons for such investigation. The oxygen consumption of S2 cells in the exponential phase of growth was measured with an oxygen electrode. The respiration rate was constant and totally inhibited by 1 mM cyanide (results not shown). Addition of increasing concentrations of DMDS inhibited progressively the oxygen consumption (fig. 26) which was reduced to 25 % of the initial rate in the presence of 30 μ M DMDS (i.e., from 11.2 nmolO₂/ml (control) to 2.7 nmolO₂/ml; see fig. 26). The residual oxygen consumption was abolished by 1 mM cyanide. When the cells were preincubated for 10 minutes with DMDS, the inhibition appeared stronger (i.e., 56 % inhibition obtained with only 10 μ M DMDS, not shown). This strong inhibition suggests that the existence of a diffusion barriers in intact cell prevents the rapid diffusion of DMDS toward its site of action. The inhibition of S2 cells respiration led us to further directly investigate the DMDS effect on the respiratory metabolism of mitochondria.

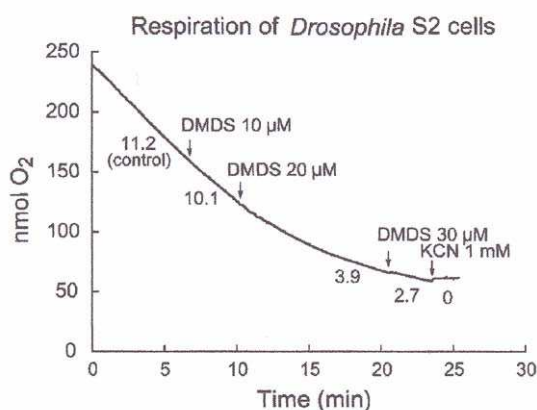


Fig. 26: Effet du DMDS sur la respiration cellulaire d'une lignée cellulaire S2 de *Drosophila melanogaster*.

Le graphique représente la consommation d'oxygène des cellules S2 à 30°C enregistrée par des électrodes à oxygène. Les flèches verticales indiquent le temps auquel l'addition de DMDS ou de KCN a été effectuée. Les nombres figurant sous le tracé correspondent aux taux de consommation d'oxygène (nmol O₂/min/ mg de protéine).

c₂) Effects of DMDS on plant mitochondria

*The effects of DMDS on the respiratory metabolism was tested using plant mitochondria isolated from imbibed pea (*P. sativum* L.) seeds. The great advantage of plant mitochondria with respect to their animal counterparts is that the respiratory electron-transport pathways comprise the cyanide-sensitive cytochrome pathway (like animals) and the cyanide insensitive alternative pathway that consists of only one protein the alternative oxidase (AOX); beyond the branch point (ubiquinone, see for details fig. 29A), the alternative pathway does not contribute to the generation of a proton-motive force, in contrast to the cytochrome oxidase pathway (Moller and Rasmusson, 1998 ; Vanlerberghe and McIntosh, 1997). Furthermore, in plant mitochondria, the NAD(P)H dehydrogenases is distinct from complex I (Moller and Rasmusson, 1998). These additional features make plant mitochondria a suitable model to better identified which complex could be specifically affected by DMDS using one of the two pathways available in plant and not in animal mitochondria.*

The function of isolated mitochondria was assessed by measurement of oxygen consumption using different energy substrates in control and in the presence of DMDS (see fig. 27). Isolated mitochondria will exhibit an initial slow rate of oxygen

consumption in the presence of energy substrate. The addition of ADP will stimulate electron transport chain activity and will initiate a rapid consumption of oxygen.

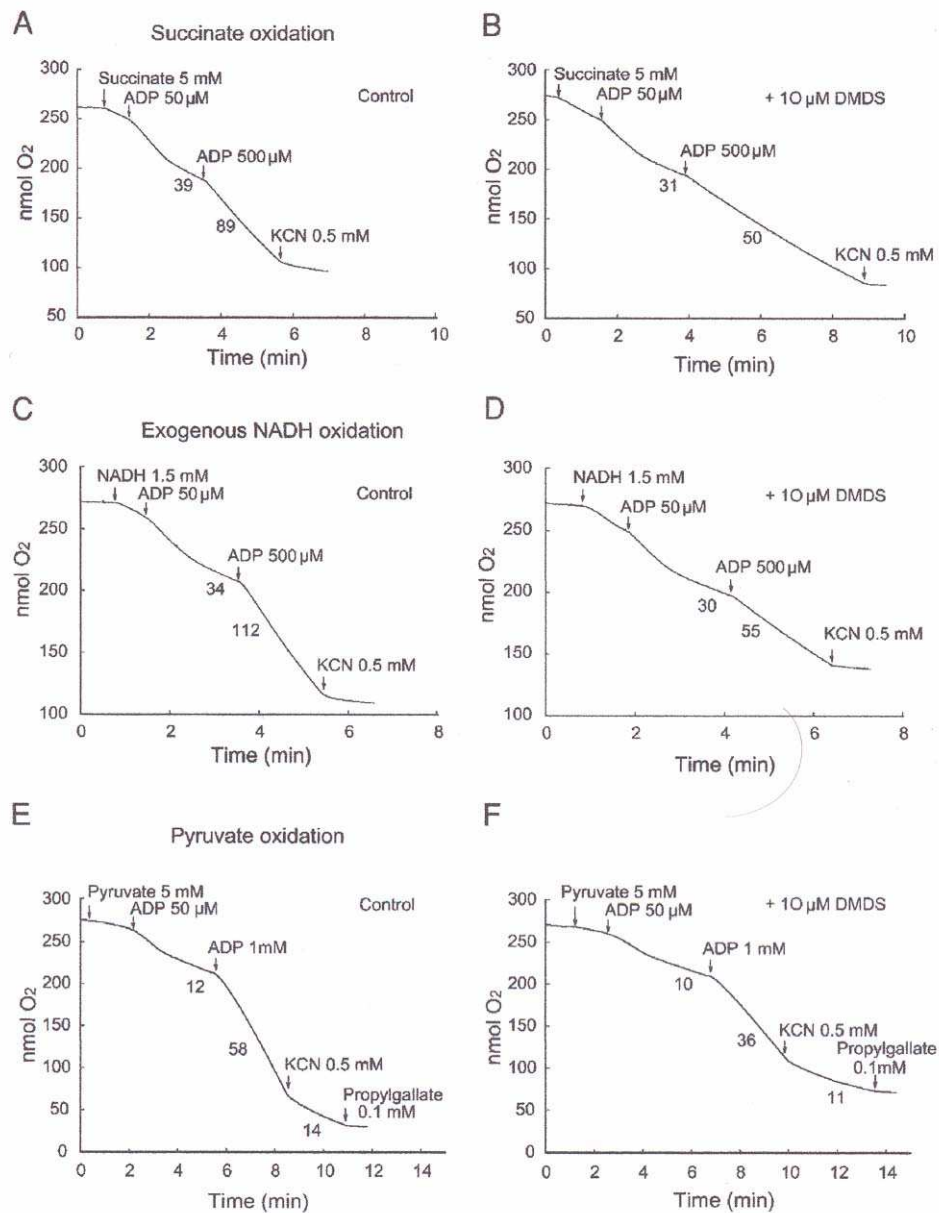


Fig. 27: Effet du DMDS sur l'oxydation des différents substrats de mitochondries isolées de *P. sativum*.

La consommation d'oxygène est enregistrée à 25°C par l'utilisation d'électrode à oxygène. Pour chaque substrat, (succinate (A), NADH (C), pyruvate (E)), les graphiques de gauche représentent les expériences contrôles, et les graphiques de droite représentent les mêmes expériences en présence de 10 μM de DMDS (B, D et F).

Les flèches verticales indiquent le temps auquel l'addition sur les substrats, des cofacteurs et des inhibiteurs, a été réalisée. Les nombres figurant sous les tracés correspondent aux taux de consommation d'oxygène (nmol O₂/min/ mg de protéine).

Consequently, using pea seed purified mitochondria, we analysed the effects of DMDS on the oxidation of various substrates that were monitored with the oxygen electrode. DMDS (10 μ M) was diluted in the electrode buffer just before starting the experiment and placed in the reaction chamber containing mitochondria. The oxidation of succinate, measured as the state III rate (in the presence of ADP), was strongly reduced by 10 μ M DMDS (44 % inhibition; fig. 27A and B), suggesting an inhibition of electron transfer. The decreased rate was likely not due to an inhibition on the ATP synthetase since a strong uncoupler like *P*-trifluoromethoxy carbonyl cyanide phenyl hydrazone (FCCP) did not reverse the DMDS inhibition (data not shown).

A similar effect of DMDS was observed on the oxidation of exogenous NADH (51 % of inhibition; fig. 27C and D), and pyruvate (40 % of inhibition; fig. 27E and F). The oxidation of these three substrates (i.e., succinate, pyruvate and NADH) involves different dehydrogenases that feed a common electron pathway from ubiquinones to complex III, cytochrome *c* and complex IV. Therefore, we thought that DMDS could either exert a general effect on all components or inhibit a specific component in the common pathway (i.e., cytochrome oxidase pathway). Careful observation of the pyruvate oxidation graph (fig. 27E and F) shows that the DMDS effect was less pronounced (21 % of inhibition) on the respiration rate after cyanide addition. In fact, in the presence of pyruvate and when complex IV was blocked by cyanide, the electrons from reduced ubiquinones were directly transferred to oxygen through the cyanide-insensitive AOX pathway (Vanlerberghe and Mc Intosh, 1997; fig. 29A). This cyanide insensitive respiration shown in fig. 27E and F, was inhibited by propylgallate, which is an inhibitor of the AOX pathway.

The weaker inhibitory effect of DMDS on this cyanide-resistant pathway suggested that its site of action was more likely localized in the complexes III-IV segment of the electron transfer chain than in the set of initial dehydrogenases.

To evaluate a possible effect at the level of complex III, we analyzed the effect of DMDS on the electron transfer from exogenous NADH to cytochrome *c*, thus bypassing complex IV. This was made by following spectrophotometrically the NADH-dependent reduction of exogenous cytochrome *c* after blocking complex IV with cyanide and rupturing the outer membrane with a calibrated amount of Triton X 100. Even at 40 μ M, DMDS was not able to inhibit the electron transfer from NADH to cytochrome *c* since the initial rate of reduction was almost identical to the

control (fig. 28A). The highest value obtained for the plateau is due to small variations in the cytochrome c concentration in the experiment.

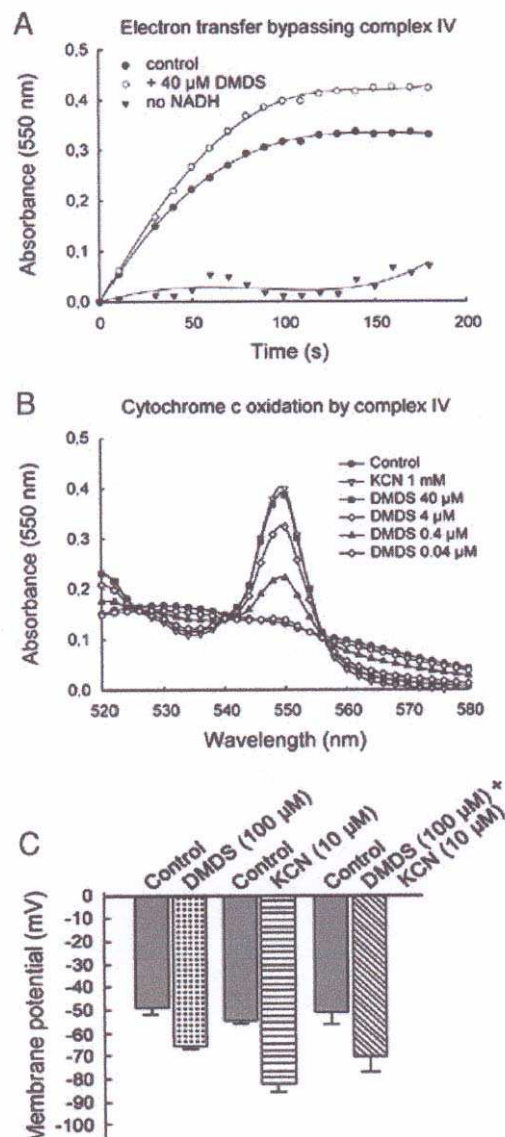


Fig. 28: Effet du DMDS sur le complexe IV (cytochrome oxydase).

A: Suivi du transfert des électrons mitochondriaux du NADH exogène au cytochrome c par spectrophotométrie en mesurant la diminution de l'absorbance du cytochrome c à 550 nm et, de ce fait, la réduction du cytochrome c par la chaîne raccourcie de transport des électrons.

B: Pour mesurer l'activité du complexe IV, les membranes mitochondriales sont incubées pendant 3 min à 25°C dans une solution contenant 40 μ M de cytochrome c réduit et différentes concentrations de DMDS. L'addition de 1 mM de cyanure (KCN) connu pour bloquer le transfert des électrons au niveau du complexe IV est également testé. Le spectre enregistré à la fin de la réaction permet de visualiser l'état d'oxydo-réduction du cytochrome c.

C: Le graphique illustre les effets de l'application externe de DMDS sur le potentiel de membrane en comparaison avec l'effet induit par l'application extracellulaire de 10 μ M de KCN. L'application de 10 μ M de KCN au niveau d'un corps cellulaire de DUM neurone prétraité par 100 μ M de DMDS ne provoque pas d'effet supplémentaire sur le potentiel de membrane ($n = 4$).

Les données sont des moyennes \pm SE.

Since all these results focused on complex IV as the site of action of DMDS, we analyzed its impact on cytochrome oxidase activity. Mitochondrial membranes were solubilized by Triton X 100, and oxidation of reduced cytochrome c by cytochrome oxidase was followed spectrophotometrically. The spectra shows that 40 μ M DMDS totally blocked the cytochrome oxidase, yielding the same effect as 0.8 mM cyanide (fig. 28B). Lower concentrations of 4 μ M and 0.4 μ M were still effective in inhibiting the electron transfer through complex IV.

Taken together, these results obtained on plant mitochondria that display two respiratory electron-transport pathways including the cyanide-sensitive cytochrome pathway (common to animal) and the cyanide-insensitive alternative oxidase pathway allowed us to precisely identified within the electron transport chain the target site of DMDS. This sulfur compound, in the micromolar range, is a powerful inhibitor of complex IV (cytochrome oxidase).

Because it was necessary to determine if DMDS neurotoxicity observed in DUM neurons occurred through mitochondrial respiratory chain complex IV dysfunction, we tested on isolated cell body KCN, which is commonly used in vitro as a rapid specific inhibitor cytochrome oxidase, the terminal enzyme of the electron-transport chain that catalyses the transfert of electrons from reduced cytochrome c to molecular oxygen. As illustrated in fig. 28C, bath application of 10 μ M KCN produced an important hyperpolarization of the membrane potential [from -55.1 ± 0.6 mV ($n = 4$) to -82.1 ± 1.3 mV, $n = 4$]. It is interesting to note that KCN did not produce any significant effect when DUM neurons were pretreated with 100 μ M DMDS (fig. 28C). These results strongly suggest that DMDS might affect the complex IV of the DUM neuron electron-transport chain.

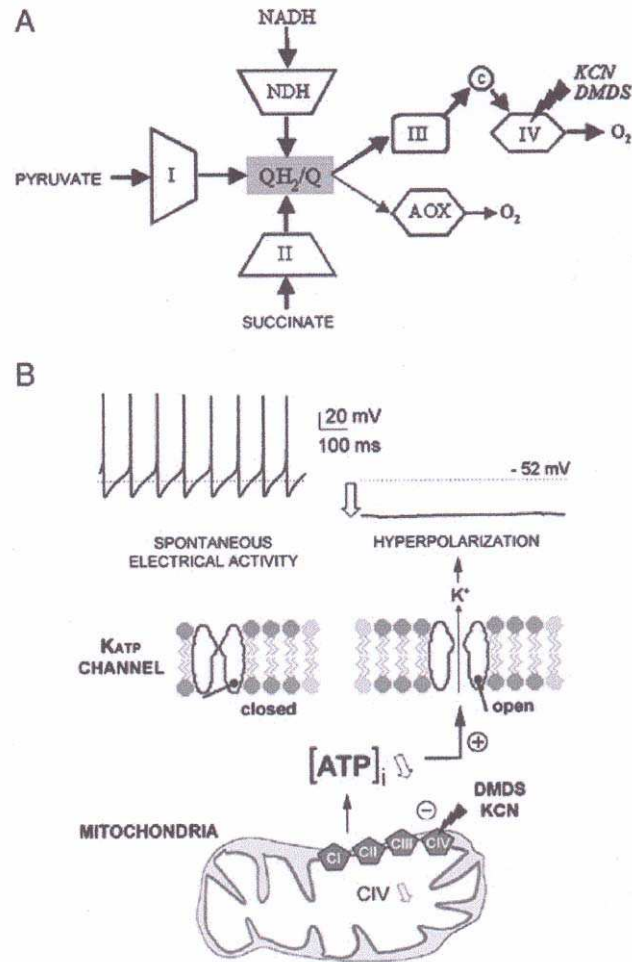


Fig. 29: **A:** Représentation schématique du transfert d'électrons dans les mitochondries végétales. Le schéma illustre la voie de transfert des électrons analysée dans cette étude. I, II, III et IV représentent les différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. NDH, NADH: déshydrogénases exogènes ; QH_2/QH : pool de l'ubiquinone ; AOX: oxydase alternative insensible au cyanure ; c: cytochrome c ; KCN: cyanure de potassium.

B: Illustration schématique de l'effet de l'inhibition du complexe IV sur le DUM neurone.

A gauche: Le DUM neurone présente une activité « pacemaker » enregistrée dans des conditions physiologiques standard. La plupart des canaux K_{ATP} sont fermés.

A droite: 100 μM de DMDS active les canaux K_{ATP} provoquant l'hyperpolarisation membranaire du DUM neurone associée à la perte complète de l'activité « pacemaker ».

2.4/ Discussion

Il a été mis en évidence lors de cette étude que le DMDS exerce une activité insecticide originale par l'inhibition de la cytochrome oxydase impliquée dans la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie. Le dysfonctionnement mitochondrial engendré par le DMDS se traduit par une modification de l'activité électrique des membranes des cellules nerveuses due à une activation des canaux K_{ATP} jusqu'alors jamais caractérisés sur les neurones d'insectes. Le mode d'action du DMDS peut être résumé par la figure 29A qui représente la chaîne de transfert des électrons au sein des mitochondries végétales qui ont été utilisées dans cette étude. Ces mitochondries ont la caractéristique de posséder, en plus des complexes présents chez les mitochondries animales, une voie NAD(P)H déshydrogénase supplémentaire et une voie insensible au cyanure (AOX). L'étude du transfert d'électrons au sein de ces mitochondries a permis de conclure que le site d'action du DMDS était identique à celui du cyanure.

Au niveau du SNC de la blatte, le DMDS par une action sur les processus présynaptiques, en inhibant la libération du neurotransmetteur, va bloquer la transmission synaptique cholinergique. Les effets du DMDS sont alors similaires à ceux engendrés par le 2,4-DNP connu pour perturber le métabolisme énergétique. Toutefois, les effets neurotoxiques de cette substance soufrée ne peuvent pas être attribués à l'activation de canaux K_{ATP} pré- ou postsynaptiques car le diazoxide ne provoque pas les mêmes effets que le DMDS et le glibenclamide ne bloque pas les effets de ce composé soufré. En revanche, au niveau des cellules nerveuses, le 2,4-DNP, l'oligomycine et le cyanure induisent des effets similaires à ceux engendrés par le DMDS. L'activité neurotoxique du DMDS est résumée par la figure 29B ; en présence de conditions physiologiques standard, les DUM neurones présentent une activité "pacemaker" et la plupart des canaux K_{ATP} sont fermés. La diminution de la concentration en ATP intracellulaire engendrée par l'effet inhibiteur du DMDS sur le complexe IV mitochondrial, provoque l'activation et donc l'ouverture des canaux K_{ATP} . Il en résulte une fuite des ions potassium vers le milieu extracellulaire ce qui induit une hyperpolarisation de la membrane des DUM neurones, accompagnée par la perte de l'activité électrique de la cellule. Du fait de l'implication des DUM neurones dans le contrôle de fonctions physiologiques vitales (Sinakevitch et al., 1996 ; Grolleau et Lapied, 2000), les effets du DMDS sur ces cellules nerveuses vont donc pouvoir provoquer la mort des insectes confrontés à cette substance. Les

canaux K_{ATP} , qui n'avaient jamais été caractérisés sur les neurones d'insectes avant cette étude, pourraient représenter une nouvelle cible pour des insecticides agissant par le biais d'un dysfonctionnement mitochondrial. Les effets du DMDS se produisent de façon similaire, que celui-ci soit introduit à l'extérieur ou directement à l'intérieur d'une cellule, ce qui suggère que ce composé pénètre bien à travers les membranes cellulaires. Les expériences réalisées avec le DMTi semblent indiquer que cette substance soufrée agit de la même façon que le DMDS (Magnin-Robert et Lapiéd, communication personnelle).

De nombreux composés insecticides agissent par l'ouverture ou la fermeture de canaux ioniques insérés dans les membranes cellulaires. Par exemple, les canaux sodium voltage-dépendant sont la cible d'un grand nombre d'insecticides de synthèse ou issus de substances végétales tels le DDT ou les pyréthrénoïdes (Zlotkin, 1999). D'autres molécules aux propriétés insecticides tels les dérivés de la nicotine agissent sur les récepteurs cholinergiques des membranes cellulaires (Nauen et al., 2001).

Les mitochondries qui sont responsables de la production d'ATP peuvent également être la cible de substances aux propriétés insecticides (Schuler et Casida, 2001). Par exemple, la roténone que nous avons déjà évoquée en introduction générale est un inhibiteur du complexe I mitochondrial (NADH/ubiquinone oxydo-réductase). Cette molécule empêche alors le transfert d'électrons du NADH au coenzyme Q avec pour conséquence une inhibition de la production d'ATP. D'autres molécules, les agents découplants (e.g le DNP utilisé dans cette étude), sont capables de dissocier l'oxydation des différents substrats avec la production d'ATP. Dans ce cas, ce n'est pas le système de transport d'électrons qui est affecté, mais il y a dissipation du gradient de proton à travers la membrane mitochondriale ce qui ne permet pas une production normale d'ATP. Enfin, d'une manière générale, les fumigants qui agissent sous une forme gazeuse, provoquent pour la plupart des dysfonctionnements mitochondriaux (Price, 1985).

Sur un plan plus appliqué, au regard de nos résultats, il semble que le DMDS et les composés secondaires des *Allium* puissent être intéressants dans le cadre d'une utilisation en tant que fumigant comme cela a déjà été proposé (Auger et al., 1994 ; 1999 ; 2002). A l'heure actuelle, deux substances, le bromure de méthyle et la phosphine, sont utilisées en fumigation, technique la plus efficace pour la protection

des denrées stockées contre les insectes. Toutefois, le bromure de méthyle, comme cela a été évoqué dans l'introduction de ce chapitre, est très néfaste pour la couche d'ozone et sera prochainement interdit. La phosphine ne semble pas très efficace du fait du temps requis pour l'élimination des ravageurs (entre 3 et 7 jours) et un certain nombre d'espèces d'insectes se développant aux dépens des denrées stockées ont déjà mis en place des phénomènes de résistance à cette molécule (Zettler et al., 1989 ; Price, 1991 ; Zettler, 1991). Dans ce contexte, de nouvelles alternatives sont recherchées pour lutter contre les insectes des denrées stockées. Les composés soufrés produits par les *Allium* semblent de bons candidats car ils sont très volatils et leur faible poids moléculaire leur permet de très bien diffuser à l'intérieur des substrats, mieux par exemple que les isothiocyanates produits par les crucifères (Dugravot et al., 2002). Ainsi, les larves de *C. maculatus*, bien que se développant à l'intérieur des grains de niébé, sont fortement affectées lors d'exposition au DMDS (Dugravot et al., 2002). Cette substance soufrée provoque également une activité ovicide importante (Dugravot et al., 2002). Enfin comme vu précédemment, le DMDS est très actif sur les lépidoptères, notamment au stade adulte (Auger et Thibout, 2002).

De plus, l'étude réalisée a montré que le DMDS altérerait le transfert des électrons et donc la production d'ATP d'une manière différente par rapport aux autres composés utilisés (Schuler et Casida, 2001), ce qui diminuerait les possibilités d'apparition de résistance croisée.

Toutefois, nous avons vu que la toxicité du DMDS vis-à-vis des mammifères et notamment des souris s'avère très importante ($CL_{50} = 1,5 \mu\text{l/l}$). Ce résultat serait bien évidemment à prendre en compte dans le cas d'une utilisation du DMDS ou des composés secondaires soufrés des *Allium* pour la protection des denrées stockées.

En plus de l'apport de renseignements indispensables pour l'utilisation des composés soufrés des *Allium* en tant que fumigants, cette étude a également permis de mettre en évidence comment pouvaient potentiellement s'exprimer les défenses soufrées des *Allium* lorsque ces plantes sont attaquées par un herbivore. Ainsi, un insecte phytophage non adapté aux *Allium* qui consommerait de fortes quantités de feuilles de ces plantes pourrait s'exposer à la toxicité des composés allélochimiques soufrés, ce qui pourrait expliquer pourquoi si peu d'espèces généralistes sont rencontrées sur les *Allium*.

Maintenant que la toxicité et le mode d'action de ces substances soufrées ont été caractérisés, il serait intéressant de rechercher si les insectes ont éventuellement mis en place des mécanismes leur permettant de diminuer leur sensibilité vis-à-vis de ces substances.

CHAPITRE 3 :

MECANISMES DE RESISTANCE DEVELOPPES PAR DES INSECTES CONFRONTES AUX COMPOSES SOUFRES DES *ALLIUM*

3.1/ Introduction

Nous avons vu précédemment lors de tests de toxicité réalisés en atmosphère confinée, que les substances soufrées émises par les *Allium*, et notamment le DMDS, étaient particulièrement toxiques vis-à-vis des différentes espèces d'insectes testées (cf. chapitre 1). Le DMDS et probablement les autres substances soufrées des *Allium* provoquent la mort des insectes qui y sont confrontés par un dysfonctionnement mitochondrial aboutissant à une diminution de la production d'ATP avec des conséquences néfastes pour le SNC des insectes (cf. chapitre 2). Toutefois la toxicité de ces substances va être différente selon les espèces d'insectes considérées. En effet, un insecte inféodé aux *Allium*, telle la larve de teigne du poireau est nettement moins sensible vis-à-vis de ces substances soufrées qu'un insecte non inféodé aux *Allium* telle la bruche *Callosobruchus maculatus* (cf. chapitre 1). Comme cela a été précédemment évoqué en introduction générale, les espèces spécialistes se sont adaptées au cours du temps à la chimie particulière de leur plante hôte et ont été ainsi amenées à développer différentes stratégies leur permettant de vivre dans un milieu riche en une ou plusieurs substances données s'avérant par ailleurs toxiques pour d'autres espèces. Ces stratégies d'évitement des défenses chimiques des plantes par les insectes spécialistes, bien que multiples et variées, sont en général spécifiques. Ces mécanismes adaptatifs peuvent parfois être de nature anatomique, permettant alors au phytophage d'éviter l'interaction du composé toxique avec la cible située dans l'organisme consommateur (Berenbaum, 1986). Un comportement particulier de l'insecte phytophage peut également permettre une diminution de l'exposition au composé toxique (Tallamy, 1986 ; Zangerl et Bazzaz, 1992). Enfin, certains phytophages peuvent transformer une substance végétale par des processus de nature biochimique, en un dérivé peu ou pas toxique avant son arrivée au niveau de la cible située dans l'organisme (Isman, 1992).

Du fait de la plus faible sensibilité des larves de la teigne du poireau vis-à-vis des substances soufrées des *Allium*, il semble donc que cette espèce a mis en place des processus particuliers, pour l'instant inconnus, lui permettant de se développer dans un environnement riche en composés soufrés.

Toutefois, des espèces d'insectes non inféodées à des plantes produisant des composés secondaires toxiques peuvent également développer des mécanismes leur permettant par la suite de mieux tolérer ces substances. Ces processus, moins spécifiques que ceux rencontrés chez les insectes spécialistes, font en général appel à

des enzymes de détoxification permettant une rapide excrétion du composé toxique. Ainsi, le système enzymatique de la glutathion S-transférase (GST) peut permettre la détoxification d'un certain nombre de substances xénobiotiques en catalysant l'addition nucléophile du glutathion sur un large spectre de composés allélochimiques (Yu, 1982). Ce système enzymatique fréquent chez les généralistes permet, par exemple, au lépidoptère *Spodoptera frugiperda* de détoxifier l'allyl isothiocyanate, composé secondaire soufré produit par les crucifères (Yu, 1987).

Nous allons donc au cours de ce chapitre, analyser si un insecte spécialiste, mais non inféodé aux *Allium*, le bruchidé *C. maculatus* est capable de mettre en place, lorsqu'il est exposé à des concentrations sublétales de DMDS, des mécanismes biochimiques lui permettant de mieux résister à une nouvelle exposition de cette substance. Ainsi, les adultes de *C. maculatus* seront tout d'abord exposés une ou deux fois à différentes concentrations de DMDS afin d'étudier l'éventuelle mise en place d'un processus de résistance après une première exposition. Puis, l'activité enzymatique GST sera dosée chez *C. maculatus* et chez les larves d'*Acrolepiopsis assectella* afin d'étudier si ce système de détoxification peut être impliqué dans les mécanismes de résistance développés par des insectes confrontés aux composés soufrés des *Allium*.

3.2/ Matériels et Méthodes

a) Matériel biologique

Les deux espèces d'insectes utilisées dans ce chapitre ont déjà été présentées dans le chapitre 1. Il s'agit de la teigne du poireau, *A. assectella*, inféodée aux *Allium* et de la bruche *C. maculatus* inféodée à des légumineuses, plantes ne produisant pas ou peu de composés soufrés.

b) Méthodes expérimentales

b₁) Analyse de la mortalité des adultes de *C. maculatus* après deux expositions au DMDS

Les tests de toxicité sont réalisés avec le même mode opératoire que celui présenté dans le chapitre 1.

Les adultes de *C. maculatus* récupérés le premier jour de leur émergence des graines sont exposés à une concentration sublétales de 0,2 µl/l de DMDS pendant 24 h. Les insectes survivants sont isolés pendant 4, 5, 6, ou 8 jours, avant une nouvelle exposition à 0,5 µl/l de DMDS. Le taux de mortalité est déterminé 24 h après la fin du second traitement soit 6, 7, 8 ou 10 jours après leur émergence et comparé avec le taux de mortalité occasionné par deux traitements témoins. Lors du premier traitement témoin (témoin A), les insectes récupérés le premier jour de leur émergence sont exposés à une seule concentration de 0,2 µl/l, et leur mortalité est déterminée 6, 7, 8 ou 10 jours après leur émergence. Lors du deuxième traitement témoin (témoin B), les insectes sont soumis à une seule exposition de DMDS de 0,5 µl/l, le 4^{ème}, 5^{ème}, 6^{ème} ou 8^{ème} jour de leur vie imaginale et la mortalité est déterminée 24 h après la fin du traitement, soit 6, 7, 8 ou 10 jours après leur émergence.

b₂) Analyse de l'activité glutathion S-transférase des insectes (fig. 30)

L'analyse de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase est déterminée chez les deux espèces après exposition ou non au DMDS.

Chez *A. assectella*, les larves de stade 4 et 5 (L₄-L₅) sont exposées à 3,5 µl/l de DMDS (concentration équivalente à la CL₅₀ ; cf. chapitre 1) et les survivantes sont utilisées 4 jours plus tard pour l'analyse enzymatique.

Chez *C. maculatus*, l'activité GST des adultes survivants à une exposition de 0,2 µl/l de DMDS lors du premier jour de leur vie imaginale, est déterminée ensuite chez les individus âgés de 4, 5, 6 et 8 jours. Cette activité enzymatique est également mesurée chez des larves L₄ extraites de leur graine, exposées ou non à une concentration de 0,8 µl/l, concentration proche de la CL₅₀.

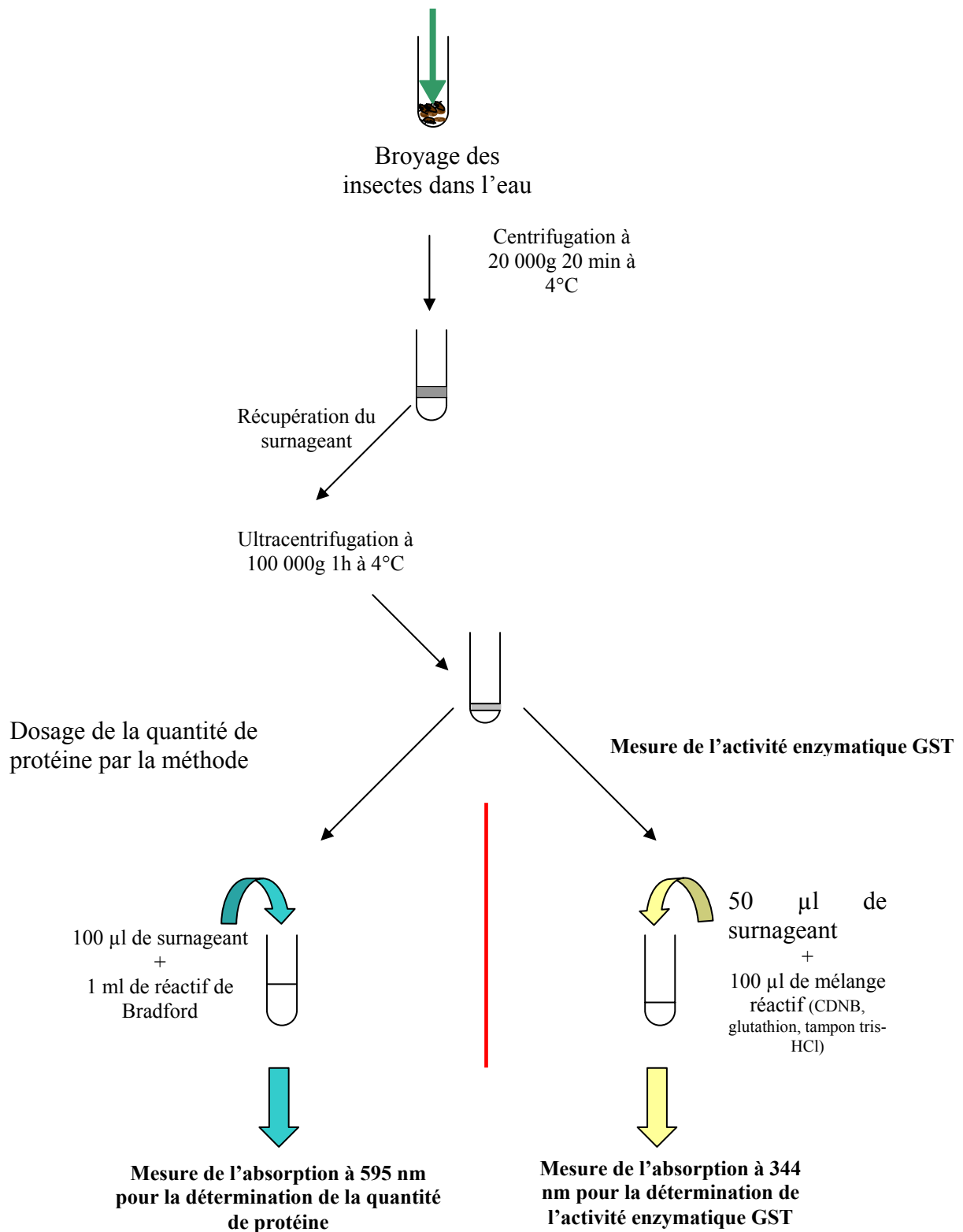


Fig. 30: Protocole utilisé pour la détermination de l'activité enzymatique GST des insectes

Pour la détermination de l'activité GST, les insectes sont broyés par lot de 40 dans de l'eau milli-Q. Le broyat est centrifugé à 20 000g pendant 20 minutes à 4°C (centrifugeuse Sigma 2K15 ; rotor nr 12148). Le surnageant est ensuite récupéré et ultracentrifugé à 100 000g pendant 1 h à 4°C (ultracentrifugeuse Beckman TL-100 ; rotor TLA 100-3). Le surnageant contenant les enzymes est de nouveau récupéré. Celui-ci est alors ajouté au mélange réactif (tampon tris-HCl pH = 6,9 ; 0,02 M ; chlorodinitrobenzene (CDNB) ; glutathion sous forme réduite). La variation d'absorbance de ce mélange à 344 nm (Yu, 1982) est ensuite calculée à 5 minutes avec un spectrophotomètre (Beckman DU). L'activité enzymatique sera alors exprimée en nanomoles de CDNB conjugué par milligrammes de protéines avec un coefficient d'extinction molaire de $9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ en utilisant la formule suivante : $(\Delta\text{DO} / \Sigma \times 10^{-6}) \times (1 / T) \times (1 / L) \times (\text{volume réactionnel} / \text{volume de l'échantillon}) \times \text{dilution}$. Avec : Σ = coefficient d'extinction molaire = $9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. L = longueur du trajet optique = 1 cm. T = durée de la réaction enzymatique = 5 minutes.

Pour chaque échantillon testé, la quantité de protéines totale est déterminée par la méthode de Bradford (1976).

c) Analyse des données

Les données d'activités enzymatiques et les taux de mortalité sont respectivement comparés par une ANOVA et un test de Khi² (χ^2) à $P = 0,05$.

3.3/ Résultats

a) Sensibilité des adultes après une ou deux expositions au DMDS

Lorsque les adultes de *C. maculatus* sont exposés une première fois à une concentration de DMDS de 0,2 µl/l le premier jour de leur vie imaginale, puis une deuxième fois à une concentration de 0,5 µl/l, le quatrième ou le cinquième jour, le deuxième traitement augmente le taux de mortalité (tableau 2). Les taux de mortalité sont significativement plus élevés que ceux observés dans le premier lot témoin (témoin A; tableau 2) qui n'ont subi qu'une seule exposition de DMDS à 0,2 µl/l. Cependant, ces taux de mortalité sont significativement plus faibles que ceux observés dans le deuxième lot témoin (témoin B) qui n'ont subi qu'une seule

exposition au DMDS à 0,5 µl/l le quatrième ou le cinquième jour de leur vie imaginaire (tableau 2).

En revanche, lorsque les individus sont exposés une deuxième fois, le sixième ou le huitième jour, les taux de mortalité observés ne sont pas significativement différents de ceux observés dans le premier lot témoin (témoin A, tableau 2). Lorsque l'intervalle de temps entre les deux expositions augmente, le deuxième traitement ne semble pas affecter la mortalité de ces individus. Les taux de mortalité observés dans ces conditions expérimentales sont de nouveau significativement plus faibles que ceux observés dans le deuxième lot témoin (témoin B, tableau 2) ayant subi une seule exposition de 0,5 µl/l de DMDS le sixième ou le huitième jour de leur vie imaginaire.

		Témoin A	Témoin B	Exposés
Jour 6	No adultes	177	160	146
	Mortalité (%)	16,3 (a)	63,1 (c)	46,5 (b)
Jour 7	No adultes	162	140	142
	Mortalité (%)	18,5 (ad)	70,0 (c)	35,9 (bf)
Jour 8	No adultes	113	120	139
	Mortalité (%)	23,6 (d)	74,6 (ec)	29,5 (df)
Jour 10	No adultes	113	93	108
	Mortalité (%)	33,6 (f)	81,6 (e)	39,8 (bf)

Tableau 2: Mortalité des adultes de *C. maculatus* après une ou deux expositions au DMDS pendant 24 h.

Témoin A: Exposition des adultes âgés de 1 jour à 0,2 µl/l.

Témoin B: Exposition d'adultes âgés de 4, 5, 6 et 8 jours à 0,5 µl/l.

Exposés: exposition à 0,2 µl/l le 1er jour, puis seconde exposition à 0,5 µl/l le 4ème, 5ème, 6ème et 8ème jour. Les données suivies de la même lettre ne diffèrent pas statistiquement (χ^2 , $P = 0,05$).

b) Analyse de l'activité enzymatique glutathion S-transférase

Chez les adultes de *C. maculatus* non exposés au DMDS, l'activité GST reste faible tout au long de la vie de l'insecte (fig. 31). Lorsque les adultes de *C. maculatus* sont exposés à une concentration de DMDS de 0,2 µl/l le premier jour de leur vie imaginale, l'activité GST des individus survivants au traitement augmente du troisième au huitième jour suivant la fin de l'exposition et reste élevée jusqu'au dixième jour.

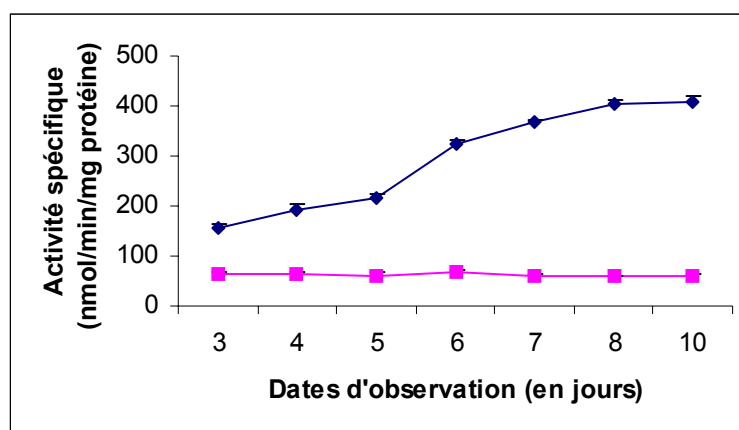


Fig. 31: Activité GST des adultes de *C. maculatus* préalablement exposés ou non au DMDS.

Carrés: Insectes témoins.

Losanges: Insectes exposés au DMDS.

Chez les larves de *C. maculatus*, les individus non traités présentent une activité enzymatique faible ($156,2 \pm 3,4$ nmol/min/mg protéine). Cependant, les larves exposées au DMDS présentent deux jours plus tard une activité enzymatique significativement supérieure ($416,6 \pm 11,8$ nmol/min/mg protéine) à celle observée chez les larves non exposées au DMDS. Chez *C. maculatus*, une exposition au DMDS provoque donc une augmentation de l'activité GST.

Chez les larves d'*A. assectella* exposées pendant 24 h à une concentrations de 3,5 µl/l de DMDS, l'activité GST est faible ($45,9 \pm 1,9$ nmol/min/mg protéine) et n'est pas significativement différente de celle observée chez les larves non exposées au DMDS ($44,9 \pm 1,4$ nmol/min/mg protéine). L'exposition des larves d'*A. assectella* au DMDS n'augmente donc pas l'activité enzymatique GST.

3.4/ Discussion

Il a été mis en évidence au cours de cette étude que les adultes de *C. maculatus* préalablement exposés à des concentrations sublétales de DMDS, présentent une sensibilité amoindrie vis-à-vis de ce composé soufré lorsqu'ils y sont de nouveau confrontés quelques jours plus tard.

En effet, les taux de mortalité des individus préalablement exposés au DMDS sont toujours inférieurs à ceux obtenus avec la même concentration (0,5 µl/l) pour des individus de même âge exposés une seule fois. Cette différence de mortalité est d'autant plus prononcée que l'intervalle de temps entre les deux traitements augmente. Ainsi, lorsque le premier traitement est effectué 6 ou 8 jours auparavant, la deuxième exposition provoque un taux de mortalité deux fois moins élevé que chez les individus de même âge exposés une seule fois à la même concentration et un taux de mortalité à peu près équivalent à celui des individus exposés à une concentration de 0,2 µl/l. La première exposition au DMDS a probablement tué les individus les plus sensibles et sélectionné les plus résistants chez lesquels des processus enzymatiques de détoxication ont pu être mis en place, permettant par la suite une meilleure tolérance au composé soufré.

En effet, il apparaît que l'activité enzymatique GST des individus traités est nettement supérieure à celle des individus non traités aussi bien chez les larves que chez les adultes. Chez ces derniers, l'activité enzymatique augmente progressivement jusqu'au 8^{ème} jour et se maintient élevée au moins jusqu'au 10^{ème} jour. Ainsi il semble que la diminution du taux de mortalité observé chez ces individus puisse être corrélée avec l'augmentation de l'activité enzymatique. L'induction du système enzymatique GST par le DMDS semble donc conférer aux individus préalablement exposés une meilleure résistance à ce composé lors d'une nouvelle exposition.

L'induction de l'activité GST a préalablement été démontrée chez les adultes de *C. maculatus* en présence d'un autre composé soufré, le méthylisothiocyanate, composé secondaire soufré produit par les plantes de la famille des capparidacées (Liénard et Haubruge, 1994). Par ailleurs, il a été montré chez les rats qu'en présence de disulfures autres que le DMDS, il y avait également augmentation de l'activité GST (Guyonnet et al., 2001). Le DMDS et très probablement les autres disulfures provoquent donc chez différents organismes une augmentation de l'activité enzymatique GST. Cette activité enzymatique GST responsable

notamment de phénomènes de résistance aux insecticides (Wei et al., 2001) permet donc très certainement une meilleure tolérance des organismes aux disulfures lors d'un nouveau contact.

L'induction d'un tel système enzymatique a probablement un coût métabolique important et donc des répercussions négatives sur la fitness des adultes survivants. Ainsi chez *Cydia pomonella*, les souches résistantes à la deltaméthrine présentent une activité enzymatique GST importante, mais ont par contre une durée de développement larvaire allongée et une fécondité diminuée (Boivin et al., 2001). De même, les adultes de *C. maculatus* exposés à des doses sublétales d'huiles essentielles végétales ont une durée de vie moins importante et une fécondité réduite suggérant l'éventuelle mise en place d'un mécanisme de détoxification coûteux (Huignard et al., 2002). Une faible fitness a également été observée chez une souche de moustiques résistante aux insecticides (Raymond et al., 1989).

Chez les larves d'*A. assectella*, l'activité enzymatique GST est faible et il n'y a pas de différence significative entre les individus exposés ou non au DMDS. Il semble donc que ce mécanisme enzymatique n'intervienne pas dans les phénomènes de tolérance des substances soufrées chez les larves de cette espèce. Chez cet insecte spécialiste d'autres stratégies probablement moins coûteuses ont dû être sélectionnées pour permettre aux larves de se développer dans un milieu riche en composés soufrés.

La présence de fortes activités GST induites par des substances allélochimiques soufrées chez des insectes non spécialistes et l'absence d'induction de ce type d'enzyme chez des insectes spécialistes de plantes productrices de composés soufrés ont déjà été observées précédemment. Ainsi, Wadleigh et Yu (1988) ont montré que chez deux espèces généralistes, *S. frugiperda* et *T. ni*, la consommation de feuilles de crucifères, induisait l'induction d'une forte activité GST permettant la détoxification de l'allyle et du benzyle isothiocyanate produit par ces plantes. Chez l'espèce spécialiste des crucifères, *Anticarsia gemmatilis* aucune induction de GST n'a été observée. De la même façon, le puceron généraliste *Myzus persicae*, présente une induction d'une activité GST importante lorsqu'il se nourrit de feuilles de crucifères, ce qui n'a pas été observé chez un puceron spécialiste de ces plantes, *Brevicoryne brassicae* (Francis, 1999). Chez ces espèces spécialistes confrontées aux substances soufrées tout au long de leur vie larvaire, des mécanismes probablement moins coûteux ont dû être sélectionnés. Les mécanismes

par lesquels la teigne du poireau parvient à tolérer ces substances allélochimiques soufrées restent pour le moment inconnus.

Chez *Plutella xylostella*, lépidoptère inféodé aux crucifères, les larves sensibles à la toxicité des isothiocyanates (Li et al., 2000) empêchent la formation de ces derniers à partir des glucosinolates précurseurs (Ratzka et al., 2002). Ces larves produisent une enzyme sulfatase dont l'activité provoque une compétition avec la myrosinase, enzyme végétale responsable de la transformation des glucosinolates en isothiocyanates, inhibant ainsi fortement la production de composés volatils toxiques par la plante (Ratzka et al., 2002). Un tel mécanisme n'a pas encore été étudié chez les larves d'*A. assectella*. Toutefois, contrairement aux larves de *P. xylostella* qui sont sensibles aux isothiocyanates, substances volatiles produites par leur plante hôte, les larves d'*A. assectella* tolèrent des concentrations importantes de substances volatiles ce qui suggère l'existence d'un processus différent pour expliquer la faible sensibilité de ces insectes vis-à-vis des substances soufrées. Les mécanismes permettant cette tolérance pourraient peut-être être le fait d'une modification de structure de la cible, la cytochrome oxydase, qui serait alors beaucoup moins sensible à ces substances soufrées. Cependant les adultes de teignes présentent quant à eux une forte sensibilité vis-à-vis de ces substances soufrées, et cela nécessiterait donc que le complexe IV mitochondrial (cytochrome oxydase) soit peu sensible au DMDS chez les larves et soit sensible chez les adultes. Enfin, l'hypothèse d'une séquestration de ces substances au niveau de la cuticule agissant comme un stockage et donc comme protection pour le reste de l'organisme semble envisageable. En effet, il a été montré récemment que les larves de teigne du poireau étaient capables de séquestrer les substances soufrées au niveau de la cuticule leur conférant une certaine protection vis-à-vis d'un prédateur généraliste, la fourmi *Myrmica rubra* (Le Roux et al., 2002).

Des expériences complémentaires doivent donc être entreprises pour déterminer précisément les mécanismes par lesquels les larves de teignes parviennent à résister à la forte toxicité de ces substances volatiles soufrées.

Sur un plan plus appliqué, la mise en place de systèmes enzymatiques chez des insectes ravageurs leur permettant de mieux tolérer ces substances soufrées est bien évidemment à prendre en compte. Ainsi lors d'une éventuelle utilisation de ces substances en fumigation pour la protection des denrées stockées, il ne serait pas

impossible de voir apparaître des phénomènes de résistance chez les ravageurs capables de faire appel à un système enzymatique de type GST.

CONCLUSION DE LA 1^{ERE} PARTIE

Au cours des trois chapitres abordés lors de cette première partie, nous avons donc pu caractériser la forte toxicité des substances soufrées volatiles émises par les *Allium*. En règle générale, le DMDS, et très certainement les autres disulfures et thiosulfonates, présentent des propriétés insecticides très puissantes vis-à-vis des insectes non inféodés aux *Allium*. En laboratoire, en atmosphère confinée, le DMDS provoque la mort dans une gamme de concentrations proche de celle du bromure de méthyle, le fumigant utilisé dans le monde entier pour la protection des denrées stockées vis-à-vis des insectes ravageurs. La mort des organismes confrontés au DMDS intervient par une action au niveau d'un complexe mitochondrial, la cytochrome oxydase, impliqué dans la production d'ATP, avec notamment pour conséquence la perte de l'influx nerveux. Toutefois, le système enzymatique GST semble permettre une détoxification du DMDS et donc une légère augmentation de la résistance de ce composé chez un insecte non inféodé aux *Allium*.

En conditions naturelles, ces substances soufrées, non seulement par des phénomènes de toxicité mais aussi de répulsion ou d'anti-appétence, confèrent un système de protection vis-à-vis des ravageurs qui semble très efficace car peu d'espèces d'insectes parviennent à provoquer des dégâts importants dans les champs de poireaux. Ce système de défense directe, impliquant des acides aminés soufrés non protéiques, une enzyme et des substances soufrées volatiles, présente une forte analogie avec le système de défense bien connu des crucifères, dans lequel interviennent également des précurseurs soufrés, une enzyme et des substances soufrées volatiles.

En revanche, nous avons vu, notamment dans le chapitre 1, que le DMDS et les autres substances soufrées émises par les *Allium* sont nettement moins toxiques vis-à-vis de la teigne du poireau. Chez ce lépidoptère, des mécanismes physiologiques certainement très spécifiques ont été sélectionnés, lui permettant de tolérer ces substances soufrées. Le système de défense naturelle de la plante faisant appel aux composés soufrés est donc nettement moins efficace vis-à-vis de la teigne du poireau qui parvient à se développer sans mortalité apparente aux dépens des feuilles du poireau.

Il s'agira donc dans la deuxième partie de ce manuscrit d'analyser plus précisément si les substances soufrées interviennent tout de même dans les processus de défense de la plante face à la teigne du poireau.

2^{EME} PARTIE :

REPONSE DU POIREAU INDUITE PAR L'ATTAQUE D'UN PHYTOPHAGE ET CONSEQUENCES SUR LES INSECTES SATELLITES

CHAPITRE 4 :

REPONSE DU POIREAU INDUITE PAR L'ATTAQUE DES LARVES D'*A. ASSECTELLA*

4.1/ Introduction

Les plantes ont la caractéristique de produire des composés secondaires qui interviennent dans les processus de défense. Cette production de composés secondaires est généralement constitutive et a lieu indépendamment du stress subi par les végétaux. Toutefois, chez un grand nombre d'espèces végétales, un stress abiotique ou biotique telle l'attaque de phytophages peut conduire à la production accrue de ces substances déjà présentes à des concentrations moins importantes (Karban et Baldwin, 1997 ; Constabel, 1999). La modification du métabolisme secondaire des plantes par l'attaque des phytophages peut se traduire par une augmentation des composés secondaires non volatils tels la nicotine chez le tabac (Baldwin et al., 1988a) ou les glucosinolates chez les crucifères (Koritsas et al., 1991 ; Bartlett et al., 1999 ; Agrawal et Kurashige, 2003) représentant ainsi un système de défense directe induit par une attaque. Cette modification du métabolisme secondaire peut également conduire à l'augmentation de l'émission de composés volatils tels les terpènes chez le maïs (Turlings et al., 1990) représentant alors un système de défense induite indirecte par le biais de l'attraction d'une espèce entomophage (Turlings et al., 1995 ; Paré et Tumlinson, 1999).

Ces mécanismes de défense induite impliquent l'activation de voies métaboliques permettant ces changements physiologiques. Chez de nombreuses plantes, l'acide jasmonique joue un rôle prédominant dans la mise en place de la réponse induite (Farmer et Ryan, 1992 ; Howe et al., 1996). Suite à une attaque, cette molécule s'accumule dans la plante et va pouvoir interagir avec de nombreux gènes en activant leur expression (Creelman et Mullet, 1997). Ainsi, l'acide jasmonique est impliqué entre autre dans l'induction de la nicotine chez le tabac (Baldwin, 1996) et dans l'émission de composés terpéniques volatils chez le maïs (Schmelz et al., 2003).

Les poireaux, comme cela a déjà été évoqué précédemment, produisent des composés secondaires soufrés qui sont des acides aminés non protéiques dérivés de la cystéine, les alk(en)ylcystéine sulfoxides, composés non volatils. Ces acides aminés, lors de la brisure des tissus de la plante, sont mis en contact avec une enzyme, l'alliinase, provoquant la formation de substances volatiles soufrées, principalement des thiosulfinates et leurs composés de dégradation, les disulfures. Ce complexe alk(en)ylcystéine sulfoxides, alliinase et thiosulfinates-disulfures intervient dans les processus de défense de la plante (cf. chapitre 1 & 2), cependant

la biosynthèse de ces substances secondaires pourrait être modifiée lors de l'attaque d'un phytophage comme c'est le cas chez de nombreuses plantes (Karban et Baldwin, 1997 ; Constabel, 1999).

Nous allons donc dans ce chapitre caractériser chez le poireau la réponse induite par l'attaque de son phytophage spécialiste, la teigne du poireau, d'une part au niveau des acides aminés non protéiques soufrés et d'autre part, au niveau des substances volatiles soufrées.

Dans un premier temps, une méthode d'analyse chimique en HPLC (méthode Pico-Tag Waters) sera utilisée pour doser les concentrations des acides aminés non protéiques soufrés de poireaux ayant été ou non confrontés à divers stress biotiques (attaques de phytophages) ou abiotiques (blessures mécaniques). Toutefois, par manque de standards de référence, nous nous sommes focalisés sur un acide aminé non protéique, le PCSO, composé précurseur du DPTi et du DPDS. Nous nous sommes également intéressés, mais dans une moindre mesure, à deux autres acides aminés, l'acide aspartique et l'acide glutamique, ce dernier étant impliqué dans les voies métaboliques de biosynthèse de substances soufrées chez le poireau (Block, 1992).

Dans un deuxième temps, des techniques de chromatographie en phase gazeuse couplée au spectromètre de masse (CG-SM) ont été utilisées pour étudier les substances volatiles émises par des poireaux confrontés ou non à des attaques de larves d'*Acrolepiopsis assectella*.

4.2/ Matériels et Méthodes

a) Matériel biologique

a₁) Le poireau

Les plants de poireau (variété Parlton) utilisés dans cette étude proviennent de cultures réalisées en plein air au CTIFL de Carquefou (Loire-Atlantique). Ils sont transplantés dans des pots de 10 cm de diamètre et sont maintenus en serre jusqu'à leur utilisation pour les expériences, 4 à 8 semaines après la transplantation. Deux lots de poireaux d'âge différent ont été utilisés, des poireaux âgés d'environ 6 mois

avec un diamètre de fût supérieur à 2 cm et d'autres, âgés de 2 mois avec un diamètre de fût inférieur à 1 cm.

a₂) Les phytophages

Les deux espèces de phytophages utilisés pour provoquer des blessures lors de cette étude ont été décrites lors du chapitre 1. Il s'agit de la teigne du poireau, *A. assectella*, lépidoptère spécialiste des *Allium*, et de *Agrotis ipsilon*, lépidoptère polyphage, élevé sur poireau. Le protocole d'attaque va différer selon l'espèce utilisée et l'expérience réalisée. D'une manière générale, pour réaliser les attaques, les larves d'*A. assectella* des deux sexes sont utilisées aux stades L₃-L₄ et les larves d'*A. ipsilon* utilisées sont de stade L₂-L₃ étant donné leur grande taille et la rapidité de leur croissance.

b) Méthodes expérimentales

b₁) Protocole d'attaque

Pour réaliser la plupart des attaques avec les larves d'*A. assectella*, celles-ci sont déposées dans la partie centrale du poireau. Les larves se nourrissent alors librement sur le poireau tout au long de la durée de l'expérience. Les larves se nymphosant avant la fin du protocole d'attaque sont alors immédiatement remplacées. Dans certains cas, les protocoles d'attaque ont nécessité l'utilisation de boîtes en plastique pour confiner les larves sur des endroits bien déterminés de la plante. Ceci sera précisé dans la partie « Résultats ». Le nombre de larves déposées et la durée de l'attaque seront également précisés dans la partie « Résultats » ainsi que dans les légendes des figures pour chaque expérience.

b₂) Méthode d'analyse de la concentration des précurseurs des substances volatiles soufrées (fig. 32)

Nous utiliserons généralement le fût non attaqué de la plante pour effectuer les dosages des concentrations en précurseurs soufrés. Toutefois, lors de certaines expériences, le dosage des concentrations en PCSO sera réalisé directement au niveau des feuilles attaquées ou non, ce qui sera alors précisé dans la partie « Résultats ».

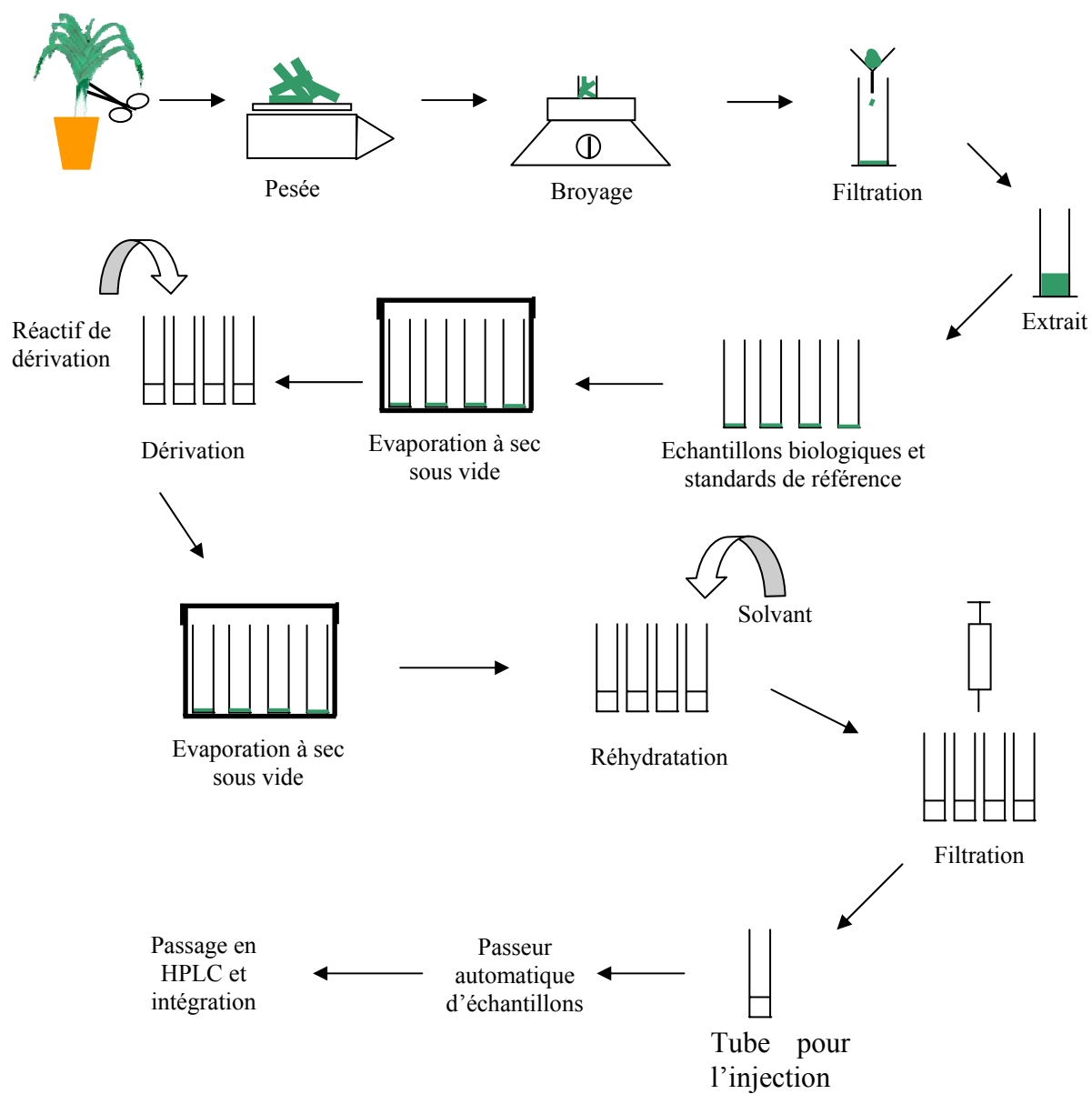


Fig. 32: Protocole de préparation des extraits de poireau pour le dosage des précurseurs soufrés.

* Préparation des échantillons

Le dosage des précurseurs soufrés chez le poireau est réalisé en RP-HPLC (Chromatographie liquide haute performance en phase inverse) : le passage des éluants se fait du plus polaire au moins polaire, et les composés étudiés sortent de la colonne dans le même ordre, du plus polaire au moins polaire. La préparation des échantillons est effectuée selon le protocole de la méthode Waters Pico-Tag (Auger et al., 1993). Elle comprend les phases suivantes :

- Extraction

La partie du poireau à doser (feuille, fût ou poireau entier) est coupée, puis pesée et rapidement broyée dans du méthanol (MeOH) à l'aide d'un broyeur électrique (le rapport quantité de MeOH/poids frais est alors noté), pendant au moins 40 secondes à température ambiante. Le broyat est ensuite filtré sur des filtres papiers plissés Whatman 114V. Les filtrats obtenus sont appelés extraits.

- Dérivation

Le principe de cette étape consiste à greffer un groupement chromophore (le réactif de dérivation) sur les échantillons de poireaux ainsi extraits. La dérivation permet alors de rendre détectable en Ultra-Violet (UV) tous les acides aminés ainsi dérivés.

- La dérivation s'effectue sur 10 µl d'extraits de poireaux préalablement filtrés sur Millex 0,45 µm.
- Ces 10 µl sont évaporés à sec sous vide (<100 millitorrs).
- A ces échantillons secs, 20 µl de réactif de dérivation contenant le phenyl-isothiocyanate (PITC) sont ajoutés.
- Après 10 minutes, temps nécessaire au développement de la réaction, chaque échantillon est à nouveau évaporé à sec sous vide à température ambiante pour éliminer l'excès de réactif.

Parallèlement aux échantillons de poireaux à doser, cette même réaction est effectuée sur 10 µl de solution standard d'acides aminés soufrés de synthèse, ici le PCSO dont la concentration est connue (2 mM). Cet acide aminé a été synthétisé au laboratoire par J. Auger et T. Doussineau selon les méthodes précédemment décrites (Auger et al., 1993). Un blanc est également préparé avec 20 µl de solution de dérivation.

Chaque échantillon est dérivé et séché puis réhydraté avec 250 µl de solvant.

* Chromatographie

- Injection

Les échantillons réhydratés sont filtrés sur Millex 0,22 μm et disposés dans un passeur d'échantillons automatique.

- Matériel utilisé

Nous avons suivi la méthode développée par Auger et ses collaborateurs (1993). Le matériel utilisé pour la HPLC est une chaîne Waters, constituée d'une pompe quaternaire (correspondant au système d'apport des solvants, d'un passeur d'échantillons automatique et d'un détecteur UV. La colonne est une « Waters Novapak C18 » (3,9 x 300 mm), elle est constituée de billes de silice sur lesquelles sont greffées des chaînes carbonées en C18. Les éluants préparés possèdent la même composition que les éluants Waters (tableau 3). L'eau distillée utilisée pour la préparation des solutions aqueuses est obtenue à l'aide d'un système de purification d'eau Milli-Q. Les éluants sont filtrés extemporanément sur membrane Millex de 0,45 μm . Le débit de passage des éluants sur la colonne est de 1 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$, selon le gradient déjà utilisé précédemment (Auger et al., 1993). Les acides aminés sont ensuite détectés en UV à une longueur d'onde de 254 nm.

Type d'éluant	Composition qualitative	Composition quantitative
A	Acétonitrile Acétate de sodium (68 mM) PH 6,45	2,5 % 97,5 %
B	MeOH Eau Milli-Q Acétonitrile	15 % 40 % 45 %

Tableau 3: Composition des éluants (méthode Pico-Tag Waters).

- Acquisition des données

L'acquisition et l'intégration des pics obtenus sont effectués à l'aide du logiciel d'acquisition et de traitement de données Millennium (Waters). Les constituants sont repérés et identifiés grâce au temps de rétention par rapport aux solutions standards. La réponse de chaque pic (soit, ici, la surface) est directement

proportionnelle à la quantité injectée, ce qui permet de quantifier chaque pic d'acide aminé soufré des échantillons par rapport au pic du standard de référence (PCSO).

Le blanc de dérivation permet de mettre en évidence les pics spécifiques au réactif de dérivation. Pour vérifier l'identification dans un échantillon biologique, on peut effectuer au moment de la dérivation une « surcharge » avec une quantité connue d'acide aminé soufré standard de synthèse.

La méthode Pico-Tag est une méthode sensible qui permet d'identifier moins de 1 nmol d'acide aminé.

Une expérience préliminaire a été effectuée afin de s'assurer que la méthode employée est fiable et répétitive. Deux dérivations sur un même lot d'extraits de poireaux a donc été réalisée. Il n'y a pas de différence significative entre les deux dérivations effectuées sur un même lot de 15 extraits. La méthode semble donc fiable et répétitive.

b₃) Dosage de l'acide jasmonique endogène

Le protocole de préparation des échantillons pour le dosage de l'acide jasmonique endogène est tiré de celui de Mueller et Brodschelm, (1994) modifié par Weber et al. (1997).

La partie du poireau à analyser est broyée dans l'azote liquide à l'aide d'un mortier dans lequel 15 ml d'éthanol est rajouté. Après agitation (2 h à 4°C) et centrifugation (15 min, 4500g à 4°C), le surnageant est prélevé et l'extrait hydroalcoolique obtenu est concentré par évaporation partielle à l'évaporateur rotatif (Rotavapor). L'extrait est ensuite purifié par le chloroforme, l'acide jasmonique préalablement ionisé en milieu acide, présentant une plus forte affinité avec le chloroforme qu'avec l'eau.

L'acide jasmonique contenu dans l'extrait est ensuite méthylé par ajout de diazométhane (Weber et al., 1997) et après évaporation complète à l'air libre, à température ambiante, l'extrait est repris dans 50 µl d'hexane.

L'échantillon est alors passé en chromatographie gazeuse (CG), l'injection préalable d'un standard (jasmonate de méthyle de synthèse) permet ensuite d'identifier le pic correspondant au jasmonate de méthyle dans des échantillons à partir des temps de rétention. L'ajout d'un témoin interne, l'acide

dihydrojasmonique (9,10-D), permet lors de l'analyse des résultats, d'effectuer une quantification du jasmonate de méthyle.

b₄) Méthode d'analyse des composés volatils émis par les poireaux

L'étude des composés volatils émis par les poireaux a été entreprise afin d'analyser les différents signaux olfactifs issus d'une plante ayant subi ou non des stress biotiques (attaque par le phytophage) ou abiotiques (blessure mécanique) et pouvant être perçus par les insectes satellites de celle-ci.

Les études réalisées précédemment, (comme nous l'avons préalablement évoqué), ont montré que les lésions des cellules végétales des *Allium* entraînaient, à partir des précurseurs soufrés et au contact de l'alliinase, la formation d'acides sulféniques, composés labiles, se réarrangeant rapidement pour donner naissance aux thiosulfonates à leur tour dégradés en mono-, di- ou tri- sulfures (Jaillais et al., 1999).

En raison de leur caractère thermolabile, l'étude des composés volatils des *Allium* par CG-SM est rendue délicate et est habituellement réalisée en HPLC. Aussi l'étude d'un tel système a nécessité, dans un premier temps, l'optimisation au laboratoire, de techniques de chimie analytique rapides et faciles à mettre en œuvre impliquant l'utilisation d'un système de CG-SM. Il a ainsi été mis au point au laboratoire, une méthode d'analyse double associant un piégeage par SPME (Solid Phase Micro-Extraction) et une extraction par solvant à une détection par CG-SM avec une colonne courte (10 m) à phase épaisse (0,4 μ m) permettant pour la première fois la caractérisation complète des vrais arômes d'*Allium* en chromatographie gazeuse (Arnault et al., 2000).

Une étude comparative des résultats obtenus en CG-SM avec ceux obtenus par HPLC a été entreprise, démontrant la possibilité d'identifier et de doser l'ensemble des produits soufrés des *Allium* par CG-SM (Mondy et al., 2002).

- Etude qualitative et quantitative des substances volatiles émises *in vivo* (CG-SM/SPME)

Cette méthode permet de détecter les composés volatils émis (headspace) par des poireaux sains, attaqués par des larves d'*A. assectella*, ou brisés mécaniquement.

- Piégeage des odeurs

Le poireau à analyser est placé pendant 30 minutes dans une enceinte climatisée aux conditions identiques à celles de la salle d'élevage décrites précédemment. La feuille dont nous voulons analyser l'émission de volatils est enfermée dans un tube en verre cylindrique (fig. 34), dans lequel une fibre SPME (Solid Phase Micro Extraction), préalablement conditionnée 2 heures à 300°C, peut être introduite. Cette fibre rétractable est recouverte d'un adsorbant (Polyacrylate, 85 µm) sur lequel sont piégées les différentes molécules constituant le bouquet odorant de la plante. Après un piégeage de 15 minutes, la fibre est, immédiatement, introduite dans l'injecteur du chromatographe. Les molécules sont désorbées par la chaleur (200°C).

○ Acquisition et traitement des données

Les analyses sont réalisées à l'aide d'un chromatographe à phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (Turbomass Perkin Elmer ®) avec un injecteur split-splitless PSS et une colonne capillaire à phase épaisse de méthylsilicone (10m x 0,32 mm x 4 µm). Le gaz vecteur est l'hélium (pur à 99,999%) et le débit est de 3,5 ml/min. La température de la colonne augmente de 5°C/min, de 70°C à 200°C en accord avec les analyses précédentes sur les produits soufrés du poireau (Auger et al., 1989). La température de la ligne de transfert et de la source est maintenue à 150°C. Les TIC (total-ion chromatogram) et les spectres de masse sont enregistrés en mode d'impact électronique (70eV). Les données sont traitées en full-scan.

L'identification des différents composés est réalisée par comparaison des temps de rétention et des spectres de masse obtenus au cours de travaux précédents (Ferary et Auger, 1996) et grâce à l'utilisation de composés synthétisés au laboratoire.

L'étude quantitative des composés piégés se fait grâce à un étalon externe de DPDS. En revanche, cette technique présente des désavantages certains pour l'étude précise de l'émission des composés soufrés des *Allium* en raison de l'extrême thermolabilité des thiosulfinates. Ces composés émis directement par les poireaux après lésion des tissus de la plante sont, en effet, dégradés lors de leurs adsorptions sur la fibre. Les principales substances détectées (disulfures) sont donc les substances de dégradation des thiosulfinates réellement émis par le poireau (Arnault et al., 2000 ; Mondy et al., 2002).



Fig. 34: Dispositif expérimental utilisé pour le piégeage des odeurs en SPME. (cliché D. Pierre).

- Etude quantitative des composés volatils potentiellement émis (CG-SM/SIR/Extraction à l'éther)

En parallèle du piégeage des composés volatils émis dans le « headspace », nous avons effectué sur les mêmes poireaux une analyse des substances volatiles potentielles des plantes. Cette méthode destructive permet la détection et la quantification des thiosulfates émis après un broyage mécanique des feuilles.

- Préparation de l'échantillon

La plante entière est coupée et broyée à l'aide d'un broyeur électrique. Le jus de poireau obtenu est filtré sur une toile à blutter. Après 60 minutes de macération nécessaire à l'accomplissement de la réaction enzymatique, précurseurs-alliinase, un échantillon de 5 ml est prélevé. Les composés volatils contenus dans l'échantillon déshydraté par saturation dans du chlorure de sodium sont ensuite extraits dans 1 ml d'éther (20% du volume). Après centrifugation (5 minutes, 8000g), la phase éther est filtrée sur une membrane de 0,4 µm et 1 µl est injecté dans le chromatographe ou congelé à – 80°C jusqu'à analyse.

- Acquisition et traitement des données

Les analyses chromatographiques sont réalisées sur le même matériel et avec le même programme que décrit pour l'analyse en SPME. En revanche, les données sont traitées, non pas en full-scan, mais en mode SIR (Selected Ion Recorded ; tableau 4). Cette méthode permet de détecter les produits recherchés et d'augmenter les limites de détection (déconvolution des pics possibles) ; (fig.35).

<i>Substances volatiles soufrées</i>	<i>Fenêtre d'enregistrement (min)</i>	<i>Masse à détecter</i>
<i>MPTi</i>	<i>2,80-4,40</i>	<i>113-122</i>
<i>MPeTi</i>	<i>2,9-4,50</i>	<i>73-136</i>
<i>PeMTi</i>	<i>3,1-4,8</i>	<i>88-136</i>
<i>PMTi</i>	<i>3-4,7</i>	<i>96-138</i>
<i>DPTi</i>	<i>6,2-7,2</i>	<i>108-124</i>
<i>Z cis et Trans</i>	<i>6,3-8,7</i>	<i>99-111-113</i>
<i>PPeTi</i>	<i>6,5-7,5</i>	<i>122-164</i>

Tableau 4 : Programme d'enregistrement en mode SIR (Selected Ion recorded).

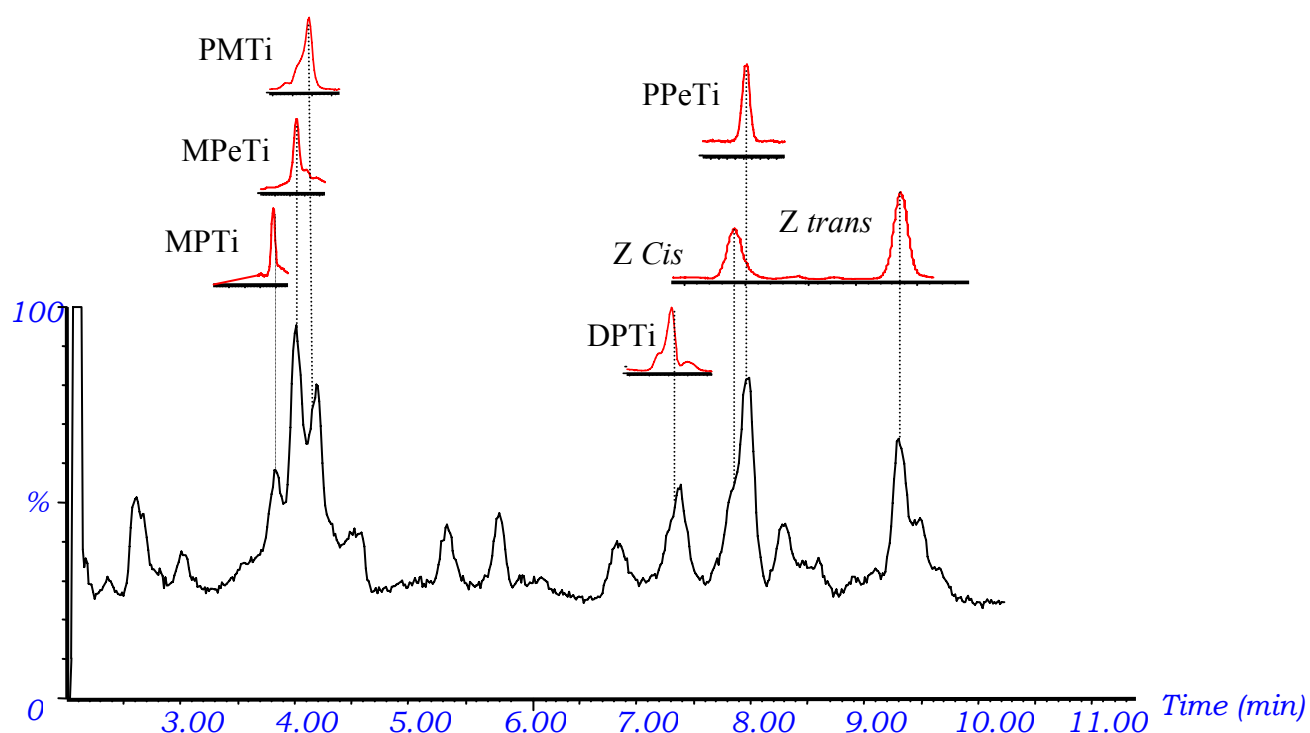


Fig. 35 : Exemple d'un spectre chromatographique des composés volatils émis par le poireau et détectés en mode SIR

Analyses statistiques

Après analyse de la loi de distribution des données par le test de Kolmogorov, le test de Mann-Whitney est utilisé pour la comparaison des moyennes de 2 échantillons. Le test de Kruskal-Wallis, suivi si nécessaire d'un test de classement à posteriori (Test de Dunn), est utilisé pour la comparaison des moyennes de k échantillons. Les données sont d'abords testées au seuil $\alpha = 0,05$ (*) puis au seuil $\alpha = 0,01$ (**) et $\alpha = 0,005$ (**).

Le nombre de répétitions effectuées est indiqué sur les histogrammes.

4.3/ Résultats

a) Analyse de la concentration en précurseurs soufrés

a₁) Effets des attaques

La première expérience a consisté à récupérer en plein champ à la Ville-aux-Dames (environs de Tours) des poireaux sains, c'est à dire ne présentant pas de trace d'attaque, et des poireaux présentant des traces bien visibles d'attaques naturelles occasionnées par des larves de teigne. L'intensité de l'attaque et le temps écoulé depuis la fin de celle-ci n'ont pas été déterminés. Cette première analyse a permis de mettre en évidence qu'un poireau attaqué en condition naturelle possède une concentration de PCSO au niveau du fût plus importante qu'un poireau sain (fig. 36 ; $P = 0,012$).

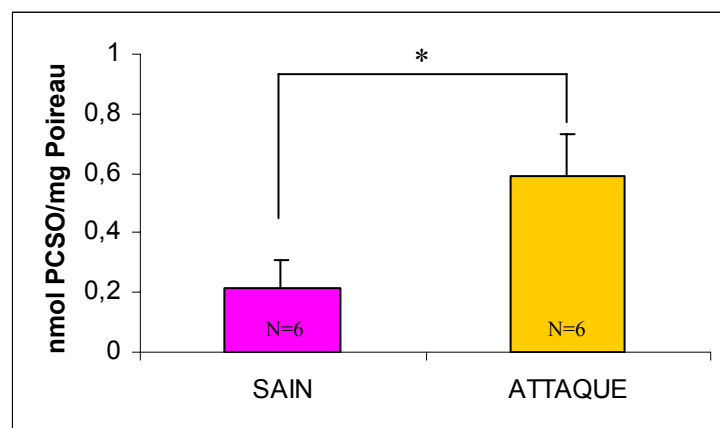


Fig. 36: Concentration moyenne (+ SE) en PCSO chez des poireaux sains et chez des poireaux attaqués naturellement en champ ($P = 0,012$).

Tous les résultats présentés par la suite ont été obtenus sur des poireaux maintenus en serre. L'âge de ces poireaux ainsi que l'intensité de l'attaque (nombre de larves attaquant et durée d'attaque) seront donc contrôlés.

Pour l'expérience présentée en figure 36, des poireaux âgés d'environ 6 mois avec un diamètre de fût supérieur à 2 cm ont été utilisés. Les poireaux sains n'ont

donc pas subit de traitements particuliers et les poireaux attaqués ont été mis en présence de 15 larves L₃-L₄ d'*A. assectella* pendant 8 jours. Les fûts de poireaux attaqués possèdent globalement des concentrations en PCSO trois fois plus élevées que celles obtenues chez les fûts de poireaux sains (fig. 37 ; $P < 0,003$). Des poireaux attaqués de 6 mois par 15 larves de teignes pendant 8 jours répondent à cette attaque par une augmentation de la concentration du précurseur soufré, le PCSO.

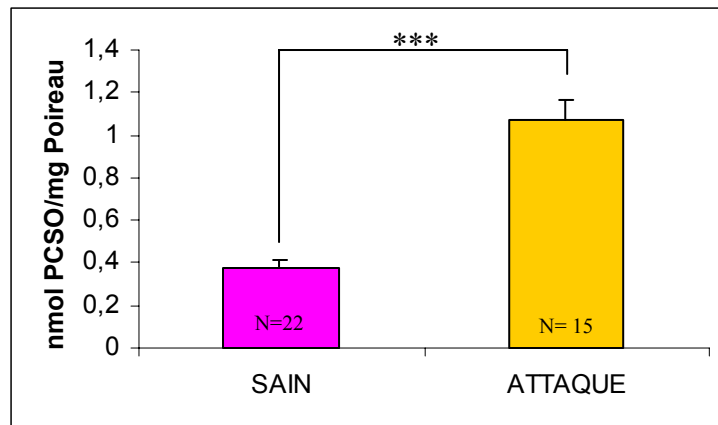


Fig. 37: Concentration moyenne (+ SE) en PCSO chez des poireaux de 6 mois sains ou attaqués par 15 larves d'*A. assectella* pendant 8 jours ($P < 0,005$).

a₂) Effets de l'intensité des attaques

Les concentrations en PCSO ont ensuite été étudiées pour savoir si elles fluctuaient lorsque les dégâts engendrés par les larves d'*A. assectella* étaient d'intensité variable. Le nombre de larves et/ou la durée des attaques chez des poireaux de 6 mois ont donc été modifiés. Des attaques de 5 larves L₃-L₄ d'*A. assectella* pendant 8 jours ou de 15 larves L₃-L₄ pendant 3 jours ne provoquent pas d'augmentation significative de la concentration en PCSO chez des poireaux âgés de 6 mois (fig. 38 ; $P = 0,774$). Il existerait ainsi un certain seuil d'intensité d'attaque en dessous duquel il n'est pas possible de détecter une réponse de la plante dans les conditions expérimentales utilisées. L'augmentation de PCSO chez des poireaux attaqués âgés de 6 mois serait donc dépendante de la durée de l'attaque et de la quantité de larves attaquantes.

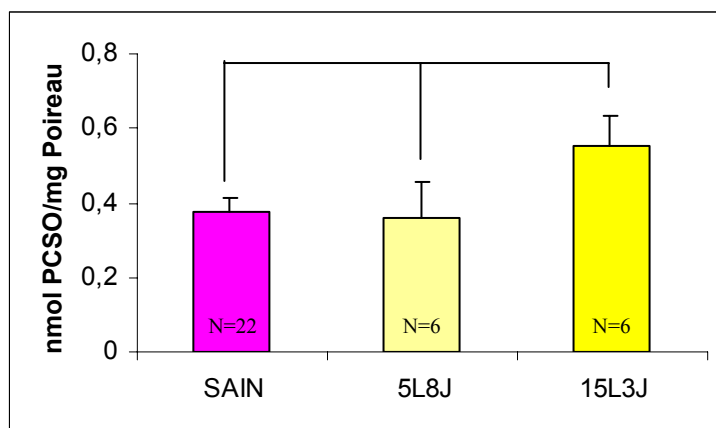


Fig. 38: Concentration moyenne (\pm SE) en PCSO chez des poireaux de 6 mois sains ou attaqués par 5 larves d'*A. assectella* pendant 8 jours (5L8J) ou par 15 larves pendant 3 jours (15L3J) ($P = 0,774$).

Lorsque les poireaux attaqués analysés sont âgés de 2 à 3 mois (diamètre de fût d'environ 1 cm), une attaque de 3 larves L₃-L₄ pendant 8 jours suffit alors pour induire une augmentation hautement significative de la concentration en PCSO (fig. 39 ; $P < 0,003$). En effet, là encore, les fûts de poireaux attaqués possèdent des concentrations environ trois fois plus élevées que les fûts des poireaux sains. Le seuil d'attaque pour déclencher une augmentation de la concentration en PCSO diminue donc parallèlement à l'âge et la taille du poireau. De plus il est intéressant de noter que globalement les jeunes poireaux, attaqués ou non, possèdent des concentrations en PCSO nettement moins élevées que des poireaux plus âgés. Les concentrations en PCSO sont environ quatre fois moins élevés chez des poireaux sains âgés de 2 mois que chez des poireaux sains de 6 mois (fig. 38 et 39). La concentration de ce métabolite soufré semble donc également augmenter avec l'âge indépendamment du stress subi par ces plantes.

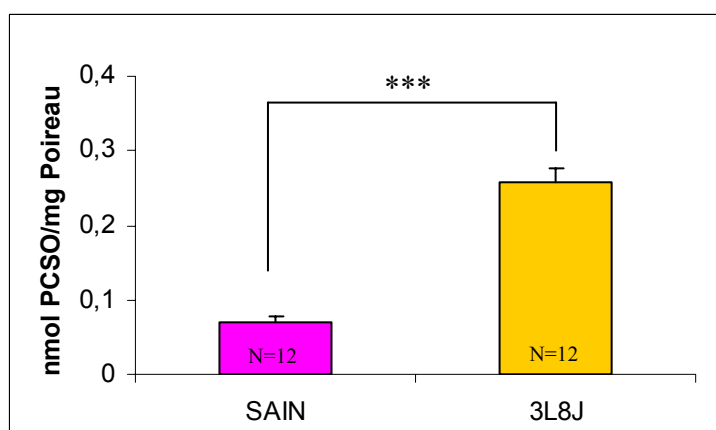


Fig. 39: Concentration moyenne (\pm SE) de PCSO chez des poireaux de 2 mois sains ou attaqués par 3 larves d'*A. assectella* pendant 8 jours (3L8J) ($P < 0,005$).

a₃) Effets d'un stress provoqué par une blessure mécanique

Des stress mécaniques ont été réalisés sur les poireaux afin d'analyser si ce type de stress abiotique pouvait induire le même type de réponse que des attaques de larves d'*A. assectella*. Pendant 8 jours, des coupures quotidiennes ont ainsi été effectuées deux fois par jour à raison de 10 coups de ciseaux de 1 cm de longueur sur différentes feuilles de poireaux âgés de 6 mois. Cette expérience n'a pas pour but de mimer précisément l'attaque des larves d'*A. assectella* mais de mettre en évidence l'éventuel effet d'un stress mécanique prolongé. Les coupures quotidiennes des feuilles n'induisent pas de modification significative de la concentration en PCSO chez les poireaux (fig. 40 ; $P = 0,144$). Lors d'une attaque de larves d'*A. assectella* sur le poireau, il semble donc que l'activité larvaire ait un rôle déterminant dans l'augmentation de la concentration en PCSO.

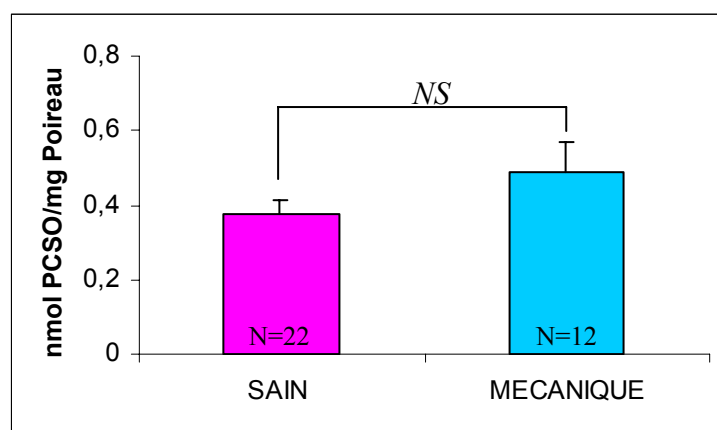


Fig. 40: Concentration moyenne (+ SE) en PCSO chez des poireaux de 6 mois sains ou blessés mécaniquement quotidiennement pendant 8 jours ($P = 0,144$)

a₄) Effets de l'intervalle de temps entre l'attaque et l'analyse

Lors des deux expériences suivantes nous nous sommes intéressés à la dynamique temporelle de la réponse de la plante après la fin de l'attaque.

Dans un premier temps, de jeunes poireaux âgés de deux mois ont été attaqués par 3 larves L₃-L₄. Sur un premier lot, la concentration en PCSO a été dosée immédiatement après une attaque de 3 jours, et sur un deuxième lot, la concentration en PCSO a été mesurée une semaine après une attaque de 3 jours. La concentration en PCSO est significativement plus élevée que chez les poireaux sains uniquement

chez le lot de poireaux testé une semaine après l'attaque de 3 jours (fig. 41 ; $P < 0,001$). Il semble donc qu'une attaque de 3 larves pendant 3 jours soit suffisante pour provoquer l'augmentation de la concentration en PCSO chez un poireau jeune à condition que la plante dispose d'un certain temps pour mettre en place la réponse à une attaque de larves d'*A. assectella*, attaque qui soit détectable dans nos conditions expérimentales.

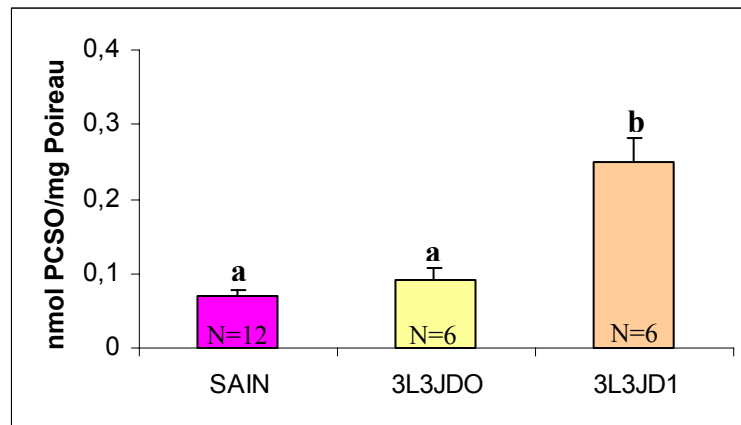


Fig. 41: Concentration moyenne (\pm SE) en PCSO chez des poireaux de 2 mois sains ou attaqués par 3 larves d'*A. assectella* pendant 3 jours avec (3L3JD1 ; D1 = délais de 1 semaine) ou sans délais (3L3JD0) après la fin de l'attaque ($P = 0,001$).

La persistance après l'attaque de la réponse du poireau a ensuite été étudiée. Pour cela, les dosages de PCSO ont été effectués immédiatement et quelques semaines après la fin de l'attaque par les larves d'*A. assectella*. Chez des poireaux de 6 mois attaqués pendant 8 jours par 15 larves L_3 - L_4 d'*A. assectella*, la concentration en PCSO se maintient élevée 2 semaines et 4 semaines après la fin de l'attaque et est significativement supérieure à celle obtenue chez les poireaux non attaqués (fig. 42 ; $P < 0,001$). Il y a donc persistance de la réponse de la plante dans le temps, même un mois après une attaque de larves d'*A. assectella*, les concentrations en PCSO dans le poireau demeurent élevées.

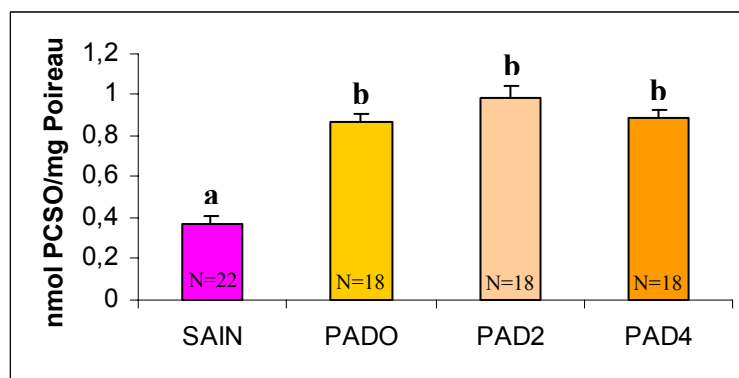


Fig. 42: Concentration moyenne (+ SE) en PCSO chez des poireaux de 6 mois sains ou attaqués par 15 larves d'*A. assectella* pendant 8 jours, avec (D2 et D4 = délais de 2 et 4 semaines respectivement) ou sans délais (DO) après la fin de l'attaque ($P < 0,001$).

a₅) Etude de la « systémicité »

Les séries d'expériences précédentes ont montré que la réponse du poireau par l'augmentation de la concentration en PCSO suite à l'attaque des teignes était détectable au niveau des zones non attaquées, ici au niveau du fût. En effet, alors que les teignes se développent dans les parties centrales du poireau, la partie du fût prélevée (7-10 cm) se situe en dessous des dégâts. De ce fait, il semble que la réponse de la plante à l'attaque de son phytophage puisse être considérée comme systémique. Toutefois, le fût regroupe la totalité des feuilles. Aussi, une nouvelle expérience a été réalisée pour tester plus précisément la « systémicité » de la réponse de la plante. Pour ce faire, des attaques ont été effectuées sur des feuilles vertes de poireaux âgés de 6 mois, en confinant des larves d'*A. assectella* dans des enceintes transparentes et aérées contenant une feuille de poireau. Les larves du phytophage ont donc été contraintes de consommer les seules feuilles vertes externes. Les concentrations en PCSO ont alors été dosées chez un même poireau sur des feuilles vertes saines et sur des feuilles vertes attaquées et comparées avec celles obtenues sur des feuilles vertes de poireau sain.

Les feuilles attaquées possèdent de plus fortes concentrations en PCSO que les feuilles saines issues de poireaux attaqués ou non (fig. 43 ; $P < 0,001$). Toutefois, les feuilles saines de poireaux attaqués possèdent également de plus fortes concentrations en PCSO que les feuilles vertes de poireaux sains (fig. 43). La réponse du poireau à l'attaque des larves d'*A. assectella* est systémique, mais la

réponse des feuilles vertes attaquées est nettement plus importante que la réponse des feuilles vertes saines du même poireau. Il y a donc à la fois chez le poireau une forte réponse locale de la plante aux attaques des larves d'*A. assectella* et une réponse systémique plus faible. Notons également, que les concentrations en PCSO obtenues au niveau des feuilles vertes de poireaux sains sont nettement moins importantes que les concentrations en PCSO obtenues au niveau du fût de poireaux sains. Ainsi, la comparaison des figures 42 et 43 montre que la concentration en PCSO de fûts de poireau de 6 mois est en moyenne de 0,38 nmol/mg alors que celle des feuilles vertes de poireau de même âge est de 0,09 nmol/mg ($P < 0,001$).

Les concentrations en PCSO sont donc plus importantes dans les parties centrales de la plante qu'au niveau des feuilles externes plus âgées.

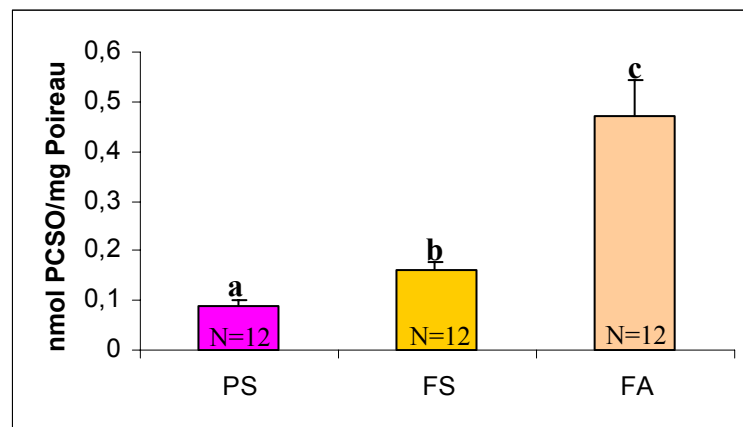


Fig. 43: Concentration moyenne (+ SE) en PCSO chez des poireaux de 6 mois dans les feuilles vertes de poireaux sains (PS), dans les feuilles vertes attaquées (FA) ou dans les feuilles vertes saines de poireaux attaqués (FS) ($P < 0,001$).

Des expériences préliminaires (non représentées graphiquement) effectuées sur des lots de 3 poireaux semblent indiquer qu'une attaque importante des larves de teigne conduit à une plus forte induction de PCSO dans les jeunes feuilles saines, en cours de croissance, situées dans la partie centrale de la plante, que dans les vieilles feuilles vertes saines situées à la périphérie.

a₆) Spécificité de la réponse du poireau

Des expériences ont été effectuées afin de savoir si la réponse du poireau à l'attaque des larves d'*A. assectella* était spécifique à cet herbivore. Les concentrations en PCSO de poireaux attaqués par les larves d'un lépidoptère

généraliste, la noctuelle *A. ipsilon* ont ainsi été analysées. Il faut noter que ces expériences ont nécessité la mise en place d'enceintes permettant le maintien des larves sur la plante, car au contraire des larves d'*A. assectella*, lorsqu'une larve d'*A. ipsilon* est déposée sur un poireau, celle-ci mange les parties les plus apicales des feuilles puis se déplace et peut quitter la plante rapidement. Les larves d'*A. ipsilon* ont donc été confinées dans des enceintes dans lesquelles une feuille de poireau a été glissée. L'attaque a été réalisée avec 5 larves L₂-L₃ d'*A. ipsilon* par poireau pendant 8 jours sur des poireaux âgés de 6 mois. Il est important de souligner que les dégâts engendrés par ces 5 larves sont largement aussi importants, si ce n'est plus que ceux engendrés par 15 larves d'*A. assectella*. Néanmoins, il n'y a pas de différence significative (fig. 44 ; $P = 0,064$) de concentrations en PCSO entre poireaux sains et poireaux attaqués par ces larves. Et même plus étrangement la tendance semble inversée car nous sommes proches du seuil de signification en faveur d'une concentration plus élevée en PCSO chez les poireaux sains. Dans nos conditions expérimentales, les larves d'*A. ipsilon* ne déclenchent pas d'augmentation de la concentration en PCSO. Des facteurs déclenchant la réponse de la plante sont peut-être présents dans la salive ou les fèces des larves d'*A. assectella* et pas dans celles des larves d'*A. ipsilon*. Il faut souligner également que le mode de consommation du végétal est complètement différent entre ces deux herbivores. D'une part la teigne est une mineuse alors que la noctuelle est une défoliatrice externe, d'autre part, les larves L₄-L₅ de teignes consomment les feuilles centrales jeunes de la plante tandis que les larves L₂-L₃ de noctuelles consomment l'extrémité des vieilles feuilles vertes externes.

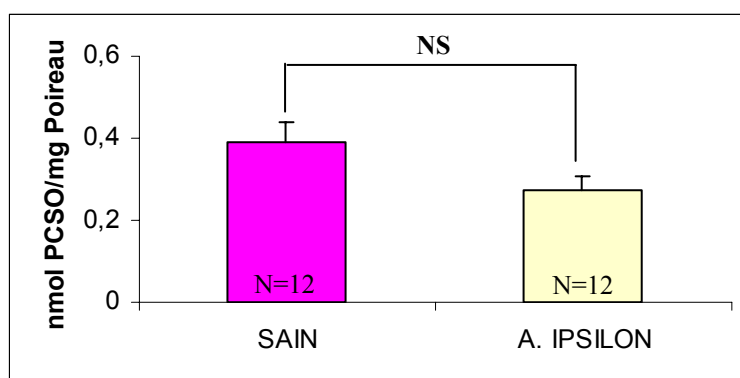


Fig. 44: Concentration moyenne (+ SE) en PCSO chez des poireaux de 6 mois sains ou attaqués par 5 larves d'*A. ipsilon* pendant 8 jours ($P = 0,064$).

a₇) Effets de l'acide jasmonique

Comme nous l'avons déjà évoqué, notamment en introduction générale, chez de nombreuses espèces végétales, l'attaque d'insectes phytophages conduit à l'activation de la voie de biosynthèse de l'acide jasmonique aboutissant à la néosynthèse de protéines de défense de la plante, à l'augmentation de la production de métabolites secondaires et/ou à l'émission accrue de composés volatils. Aussi des expériences ont été réalisées afin d'analyser si l'acide jasmonique pouvait également intervenir chez le poireau dans la réponse mise en place lors de l'attaque de larves d'*A. assectella*.

Dans un premier temps, l'acide jasmonique a été identifié chez des poireaux sains et attaqués (fig. 45). Bien que les effectifs disponibles ne nous aient pas permis de faire une analyse statistique, il semble que les poireaux attaqués aient malgré tout des concentrations en jasmonate de méthyle supérieures à celles retrouvées chez les poireaux sains. Ensuite, l'influence de l'acide jasmonique sur la variation de la concentration en PCSO a été testée, par badigeonnage quotidien d'une solution de cette molécule à 10 mM pendant 8 jours sur des poireaux sains âgés de 6 mois. Les poireaux traités quotidiennement à l'acide jasmonique pendant 8 jours possèdent une concentration en PCSO significativement supérieure à celle retrouvée chez les poireaux sains (fig. 46 ; $P = 0,018$). La présence plus importante d'acide jasmonique dans la plante après attaque des larves d'*A. assectella* pourrait donc être en partie responsable de cette augmentation de la concentration en PCSO.

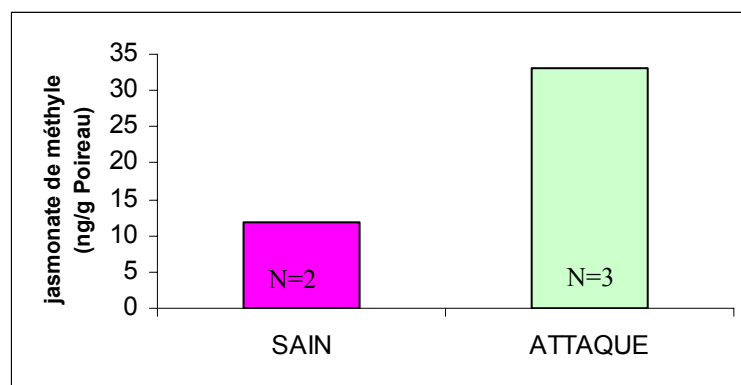


Fig. 45: Concentration en jasmonate de méthyle chez des poireaux de 6 mois sains ou attaqués par 15 larves d'*A. assectella* pendant 8 jours.

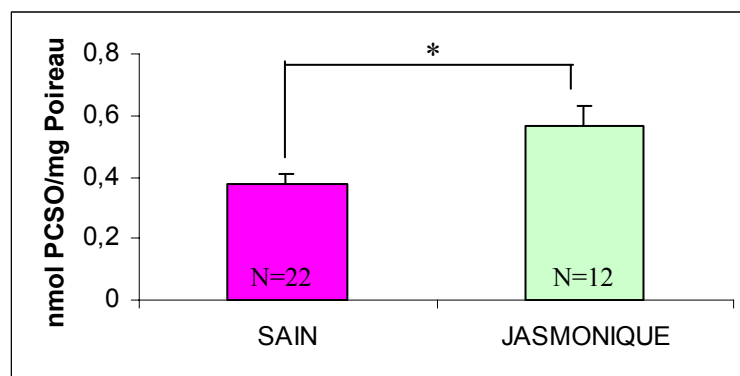


Fig. 46: Concentration moyenne (\pm SE) en PCSO chez des poireaux de 6 mois sains ou traités quotidiennement par 10 mM d'acide jasmonique pendant 8 jours ($P < 0,025$).

a₈) Effets des attaques sur la concentration en acide aspartique et acide glutamique

La méthode d'analyse chimique Pico-Tag utilisée pour le dosage des acides aminés soufrés précurseurs, permet aussi le dosage des autres acides aminés de la plante. Dans l'ensemble des expériences réalisées, il est apparu que, à l'exception de l'acide aspartique et l'acide glutamique, les concentrations en acides aminés variaient peu. Il a donc paru particulièrement intéressant d'observer les variations de concentrations de ces deux acides aminés, l'acide glutamique étant notamment impliqué dans la voie de biosynthèse des composés soufrés (Block, 1992). Les concentrations en acide aspartique et en acide glutamique ont donc été dosées chez des poireaux âgés de 6 mois, attaqués ou non par 15 larves d'*A. assectella* pendant 8 jours. Les poireaux attaqués possèdent des concentrations d'acide aspartique et d'acide glutamique significativement supérieures (fig. 47 ; $P_{asp} = 0,005$ et $P_{glu} = 0,018$) aux concentrations obtenues chez les poireaux sains. Une forte attaque de larves d'*A. assectella* provoque donc une augmentation de la concentration de ces deux acides aminés. Toutefois la comparaison des figures 37 et 47 indique que ces deux acides aminés semblent augmenter moins fortement que le PCSO pour des attaques d'intensité équivalente chez des poireaux de même âge.

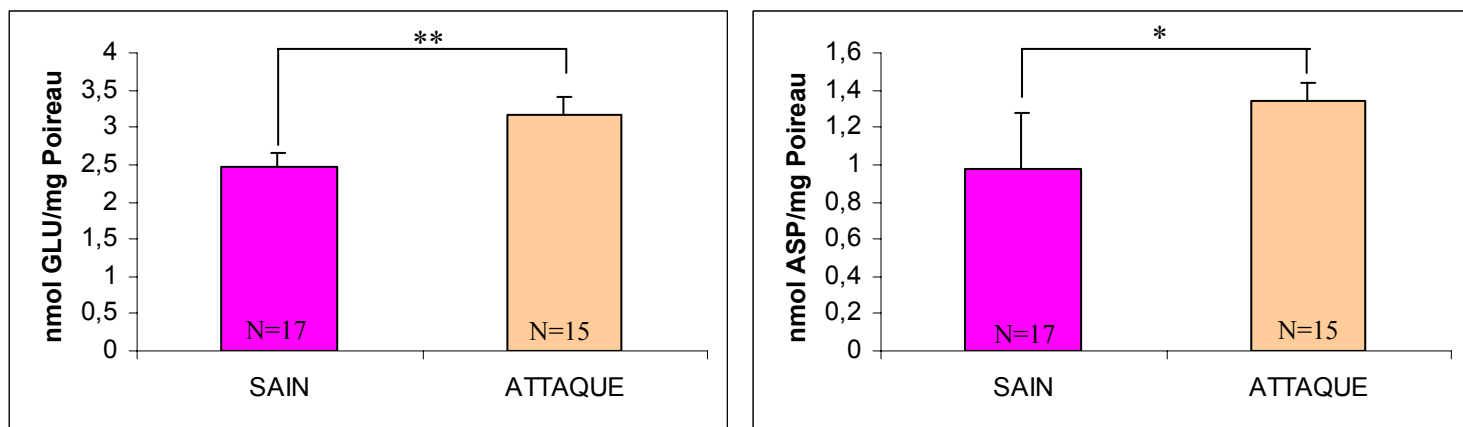


Fig. 47: Concentration moyenne \pm SE en acide glutamique (à gauche) et en acide aspartique (à droite) chez des poireaux de 6 mois sains ou attaqués par 15 larves d'*A. assectella* pendant 8 jours ($P_{\text{glu}} = 0,005$ et $P_{\text{asp}} = 0,018$).

b) Analyse de l'émission des composés volatils

b₁) Analyse qualitative

La technique de SPME a permis d'analyser de façon qualitative, les composés volatils émis *in vivo* par les poireaux. Un poireau sain âgé de 6 mois n'émet aucune odeur détectable dans les conditions expérimentales utilisées. En revanche, des poireaux attaqués par les larves d'*A. assectella* ou brisés mécaniquement émettent d'une part des composés volatils à odeur verte, en particulier du trans 2-hexenal, du 2-hexen-1-ol, et du cis-3-hexenylacétate et d'autre part des composés volatils soufrés, les thiosulfinates, qui se dégradent durant le processus chromatographique en di- et tri-sulfures (fig. 48). Le profil chromatographique du bouquet de composés volatils émis par un poireau immédiatement au moment de l'attaque par les larves de teigne du poireau ou par un poireau brisé mécaniquement ne diffère pas qualitativement (fig. 48). Les brisures mécaniques n'ont pas été quantifiées par rapport à l'attaque du phytophage, ce qui explique très probablement les différences de surface des pics obtenus (fig. 48).

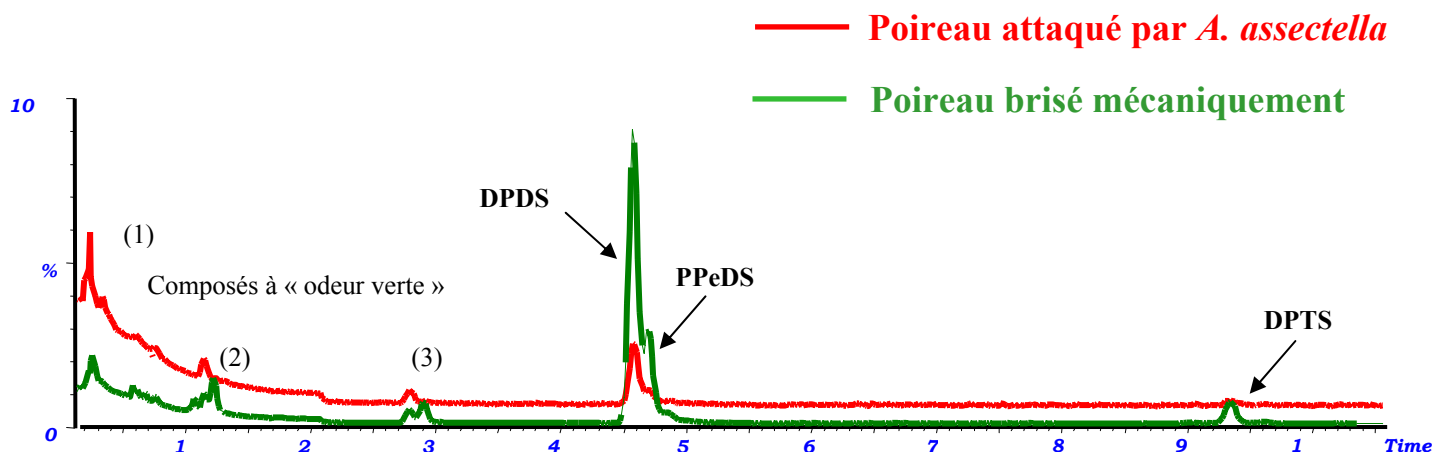


Fig. 48: Profil chromatographique d'un poireau brisé mécaniquement (vert) et d'un poireau attaqué par des larves d'*A. assectella* (rouge). DPDS : Disulfure de dipropyle ; PPeDS : Disulfure de propyle propényle ; DPTS : Trisulfure de dipropyle ; Composés à « odeur verte » : (1) Trans-2-hexenal, (2) 2-hexen-1-ol, (3) cis-3-hexenylacétate.

b₂) Analyse quantitative

L'étude quantitative, par la technique de SPME, des composés volatils émis *in vivo* par la plante, a été réalisée chez des poireaux de 6 mois, sains et attaqués par 15 larves d'*A. assectella* pendant 8 jours. Pour effectuer le piégeage des odeurs émises par ces deux types de poireaux, les feuilles sur lesquelles sont réalisés les prélèvements sont coupées méthodiquement de la même façon, à raison de dix coups de ciseaux de 1 cm de long. Les poireaux préalablement attaqués émettent des quantités de composés volatils plus importantes que les poireaux non attaqués (fig. 49). Ainsi, la quantité de disulfure de dipropyle (DPDS), la quantité de disulfure de propyle propényle (PPeDS) de même que la quantité totale de disulfures (TDS) sont significativement plus importantes chez les poireaux préalablement attaqués ($P_{\text{DPDS}} = 0,015$; $P_{\text{PPeDS}} = 0,004$; $P_{\text{TDS}} = 0,012$).

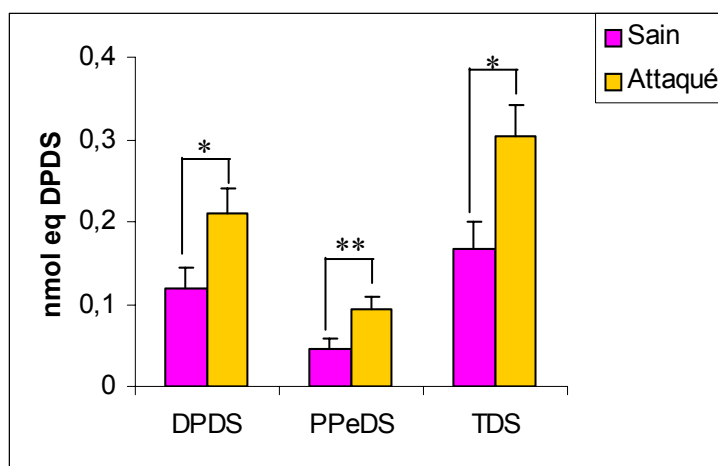


Fig. 49: Moyenne \pm SE de la quantité de disulfures de dipropyle (DPDS), de disulfures de propyle propényle (PPeDS) et de l'ensemble des disulfures (TDS) émis par un poireau de 6 mois sain ou préalablement attaqué par 15 larves d'*A. assectella* pendant 8 jours ($P_{\text{DPDS}} = 0,015$; $P_{\text{PPeDS}} = 0,004$; $P_{\text{TDS}} = 0,012$).

Une analyse en composantes principales (ACP) de l'ensemble des composés volatils soufrés détectés par la technique d'extraction à l'éther et donc potentiellement émis par le poireau indique la présence de deux groupes distincts correspondant aux deux lots de poireaux, les poireaux sains et les poireaux attaqués (fig. 50). Ceci suggère l'existence d'une différence de composition quantitative du spectre de composés volatils soufrés émis par les poireaux sains et par les poireaux attaqués. Il semble donc qu'une attaque importante de larves de teigne du poireau qui comme vu antérieurement va provoquer une augmentation de la quantité de précurseurs puisse engendrer aussi des modifications du spectre de substances volatiles soufrées émises lors de nouvelles blessures des tissus de la plante.

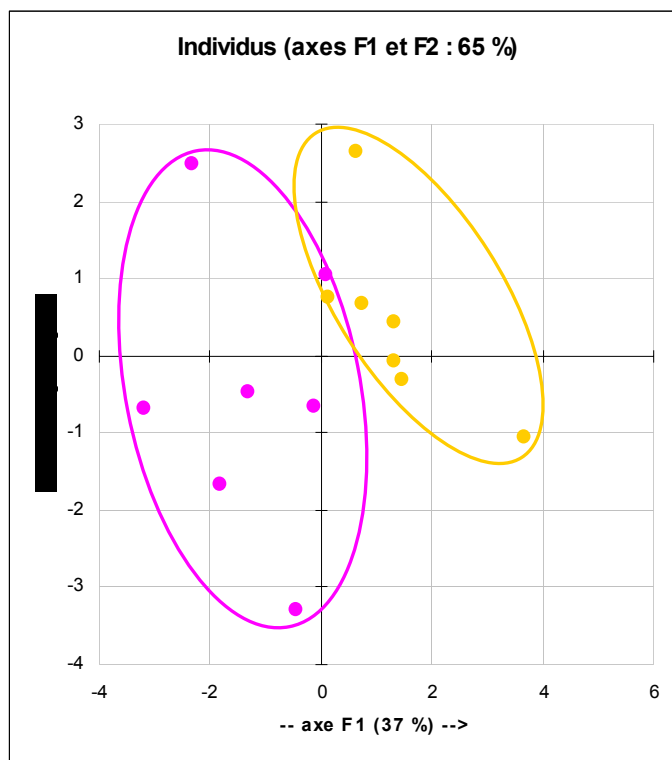


Fig. 50: Analyse en composantes principales (ACP) de la composition du spectre de substances volatiles soufrées potentiellement émis par un poireau sain (rose) et par un poireau attaqué par 15 larves d'*A. assectella* pendant 8 jours (jaune).

4.4 Discussion

Les expériences de chromatographie liquide ont donc montré que les poireaux répondent à certaines attaques du phytophage spécialiste des *Allium*, *A. assectella* par une augmentation de la concentration des précurseurs soufrés.

Cette augmentation de métabolites secondaires soufrés est dépendante de l'intensité de l'attaque, c'est à dire du nombre de larves attaquant et/ou de la durée de cette attaque. En effet, des attaques peu importantes (petit nombre de larves et/ou courte durée) ne permettent pas de mettre en évidence une réponse de la plante dans les conditions expérimentales utilisées. De même, la réponse induite chez le cotonnier, *Gossypium hirsutum*, par l'attaque de larves de *Spodoptera littoralis* dépend de la quantité de dégâts infligés à la plante par l'herbivore (Anderson et al., 2001). Chez *Brassica napus*, la concentration en glucobrassicine s'accroît en

fonction de l'intensité de l'attaque infligée par les larves de *Delia floralis*, ce qui n'est pas le cas des 13 autres glucosinolates analysés (Hopkins et al., 1998).

La sensibilité de la plante aux attaques varie également en fonction de son âge, de jeunes plantes répondant à des attaques de plus faible intensité. Ainsi le seuil d'attaque déclenchant une réponse détectable dans les conditions expérimentales utilisées, dépend de l'âge de la plante. La plante aurait donc besoin de stimuli suffisamment importants issus de l'activité des larves d'*A. assectella* pour qu'il y ait augmentation de la production de substances soufrées. De plus, cette augmentation de précurseurs soufrés dans la plante après attaque a probablement un coût métabolique non négligeable comme c'est le cas chez les crucifères lors de l'induction de la production de glucosinolates (Siemens et Mitchell-Olds, 1998) ou chez les plantes du genre *Nicotiana* lors de l'induction de la production de nicotine (Baldwin, 1998 ; 1999). Ainsi, du fait du coût métabolique probable de la production de composés soufrés, la plante n'investirait pas dans la biosynthèse de composés soufrés lorsque l'attaque n'est pas assez importante, surtout chez les plantes âgées très probablement moins sensibles aux attaques.

Des dommages mécaniques répétés n'induisant pas la réponse recherchée chez le poireau, il existerait donc des substances liées à la présence des larves du lépidoptère (dans la salive ou les fèces) qui seraient responsables de l'induction de la réponse chez le poireau. Pour s'en assurer des expériences avec dépôts de régurgitations ou de fèces larvaires sur le poireau auraient été nécessaires. De la même façon, la réponse induite chez le radis sauvage, *Raphanus raphanistrum*, est déclenchée par l'attaque d'un insecte phytophage mais pas par des coupures mécaniques (Agrawal, 1998 ; 1999), suggérant que la salive larvaire est nécessaire pour la mise en place de la réponse induite chez ce végétal. D'autres expériences ont également montré que la salive larvaire ou les fèces étaient responsables de l'induction de la réponse chez les plantes (Turlings et Tumlinson, 1992 ; Turlings et al., 1993 ; Mattiacci et al., 1995 ; Alborn et al., 1997 ; Neveu et al., 2002). Chez certains insectes la substance déclenchant la réponse a même été identifiée. Ainsi, chez *Pieris brassicae* et chez *Spodoptera exigua*, ce sont respectivement la β -glucosidase et la volicitine, présentes dans la salive des chenilles qui sont responsables de la réponse induite chez la plante (Mattiacci et al., 1995 ; Alborn et al., 1997). Cependant, chez *Brassica napus* et chez *Brassica rapa*, des coupures

mécaniques, induisent au même titre que l'attaque du coléoptère *Phyllotreta cruciferae*, une augmentation de certains glucosinolates (Bodnaryk, 1992).

La réponse du poireau aux attaques est relativement longue à se mettre en place. En effet chez des poireaux âgés de deux mois, une attaque de 3 larves pendant 3 jours ne déclenche pas immédiatement d'augmentation de la concentration des précurseurs soufrés. Cependant plusieurs jours (8 jours) après cette même attaque, il y a augmentation de la concentration en PCSO. Le processus métabolique par lequel la plante produit *de novo* des substances soufrées ne paraît donc pas être immédiat. Ce processus n'est pas spécifique aux *Allium* puisque chez le tabac, l'augmentation maximum de nicotine, se produit 7 à 8 jours après le début de l'attaque (Baldwin, 1989). De même, l'attaque des larves de *S. littoralis* induit une réponse importante chez le cotonnier 5 à 10 jours après le début de l'attaque, mais pas après 1 à 3 jours d'attaque (Anderson et Alborn, 1999 ; Anderson et al., 2001).

Cette augmentation induite de métabolites soufrés chez le poireau se maintient dans le temps, au moins un mois après l'attaque. Une fois l'attaque terminée, s'il y a retour à des concentrations équivalentes à celles obtenues chez les poireaux non attaqués, ce ne peut être qu'après un temps supérieur à un mois. Des plantes préalablement attaquées pourraient donc avoir pendant un laps de temps important, des taux de substances soufrées nettement plus forts que des plantes n'ayant subi aucune attaque. Dans le cas où cette augmentation de précurseurs soufrés aurait des conséquences néfastes sur le développement ou le comportement d'insectes phytophages, cela permettrait à la plante d'être mieux protégée par la suite contre les phytophages, par des mécanismes de défenses directes induites. La plante pourrait être ainsi protégée contre les descendants des insectes ayant commis les premiers ravages. Un tel phénomène s'apparenterait à une sorte de réponse immunitaire, « immune-like response » (Agrawal, 1998), permettant à la plante une fois induite d'être mieux protégée lors d'attaques postérieures. Toutefois, il n'en est pas toujours de même, ainsi, chez le tabac, la concentration de nicotine retrouve sa valeur normale 14 jours après l'induction (Baldwin, 1989) et, la résistance induite des plants de soja, *Glycine max*, disparaît une vingtaine de jours après la fin de l'attaque par le coléoptère phytophage, *Epilachna varivestis* (Underwood, 1998).

La réponse du poireau aux attaques d'*A. assectella* semble pour le moins être partiellement systémique. En effet des feuilles saines de poireaux attaqués possèdent

de plus fortes concentrations en PCSO que des feuilles saines de poireaux sains. Malgré tout, cette « systémicité » ne paraît pas très marquée car les concentrations en PCSO obtenues à partir des feuilles saines de plantes attaquées sont elles-mêmes nettement moins élevées que celles obtenues au niveau des feuilles attaquées. Il y aurait donc à la fois une forte réponse locale à l'attaque et une augmentation des concentrations des métabolites soufrés dans le reste de la plante. L'induction systémique de composés secondaires a été également observée chez de très nombreuses plantes (Green et Ryan, 1972 ; Baldwin, 1988b ; Turlings et Tumlinson, 1992 ; Potting et al., 1995 ; Cortesero et al., 1997 ; McAuslane et al., 1997 ; Mattiacci, et al., 2001a ; Neveu et al., 2002). Cependant, il n'est pas certain que cette augmentation de substances soufrées se fasse de la même façon dans toutes les parties de la plante. La théorie de l'« Optimal Defense » (McKey, 1979 ; Rhoades, 1979 ; Zangerl et Bazzaz, 1992), prévoit que l'allocation des défenses directes au sein de la plante se fait principalement dans les tissus qui ont la plus forte probabilité d'être attaqués et dans les parties de la plante qui ont une valeur de fitness élevée. Chez le tabac, les concentrations de nicotine induites sont plus importantes au niveau du méristème floral et des jeunes feuilles qu'au niveau des vieilles feuilles (Ohnmeiss et Baldwin, 2000). Ainsi, la forte induction de PCSO après une attaque importante de la plante dans les jeunes feuilles saines en comparaison avec l'induction nettement plus faible dans les vieilles feuilles vertes saines, observées lors d'expériences préliminaires pourrait s'expliquer de cette façon. En effet, les feuilles vertes externes du poireau sont celles qui sont le moins attaquées par les larves d'*A. assectella*, et bon nombre de ces feuilles dépérissent avant la floraison de la plante.

Les expériences d'attaques effectuées avec une autre espèce de phytophage, *A. ipsilon* tendent à indiquer que la réponse de la plante telle qu'elle a été étudiée, est spécifique de l'herbivore. En effet, même en présence de fortes attaques de ce lépidoptère généraliste, il n'y a pas accroissement de la concentration du métabolite soufré dans le poireau. Ainsi, les substances déclenchant la réponse du poireau présentes chez les larves d'*A. assectella*, seraient absentes chez les larves d'*A. ipsilon*. Toutefois, selon Schultz (2002), les insectes phytophages ne déclenchant pas de réponse chez la plante qu'ils consomment feraient figure d'exceptions. L'attaque par les larves d'*A. ipsilon* pourrait donc induire une réponse chez le poireau qui ne ferait pas intervenir les substances soufrées et qui s'exprimerait donc différemment

de celle induite par les larves d'*A. assectella*. De la même façon, les plants de tomate ne développent pas la même réponse lorsqu'ils sont attaqués par le puceron *Macrosiphum euphorbiae* ou par les larves de *Heliothis zea* (Stout et al., 1998).

Cette étude a montré également que l'acide jasmonique était présent dans le poireau et qu'il semblait être en concentration plus importante chez les poireaux attaqués. De plus, des applications quotidiennes d'acide jasmonique déclenchent également une augmentation de la concentration en PCSO. L'activation de la voie de l'acide jasmonique intervient chez de nombreuses plantes pour la mise en place de la réponse induite par des insectes phytophages (Thaler et al., 1996 ; Baldwin, 1998). Cependant, au regard des fortes concentrations utilisées lors de l'application d'acide jasmonique et de l'effet inducteur modéré provoqué sur les concentrations de PCSO, il semble peu probable que la réponse du poireau par l'augmentation de la concentration des métabolites soufrés puisse être expliquée par la seule activation de la voie de l'acide jasmonique, même si celle-ci intervient bien effectivement. Ainsi d'autres voies métaboliques pourraient être activées lors de l'attaque des larves de teigne du poireau, voies qui, en synergie avec l'acide jasmonique pourraient alors provoquer cette forte induction de PCSO. Un cas comparable existe chez le maïs où l'activation de la voie de l'acide jasmonique et de l'éthylène provoque l'émission accrue de composés terpéniques (Schmelz et al., 2003). De plus, des travaux réalisés sur l'oignon, plante appartenant comme le poireau au genre *Allium*, ont montré que l'attaque d'insectes phytophages augmentait la production d'éthylène (Kendall et Bjostad, 1990). Ainsi la voie de l'acide jasmonique et celle de l'éthylène pourraient être impliquées dans la réponse induite chez le poireau.

Lors de cette étude, le PCSO a été le seul précurseur soufré étudié pour des raisons techniques. Cependant, l'acide glutamique intervenant dans la voie de biosynthèse des précurseurs soufrés augmente également après une forte attaque de larves de teigne. De plus, des expériences préliminaires effectuées avec une autre technique de chromatographie liquide développée très récemment au sein du laboratoire (Arnault et al., 2003) a permis de doser les concentrations des autres précurseurs soufrés présents chez le poireau. Ainsi, le MCSO et le PeCSO augmentent également fortement après une attaque importante des larves d'*A. assectella* (Auger et Arnault, communication personnelle). Il semble donc que la concentration de tous les acides aminés soufrés non protéiques, précurseurs des composés soufrés volatils, augmentent dans le poireau en réponse à l'attaque des

larves d'*A. assectella*. Cette technique chromatographique a permis également d'observer que les deux dipeptides, le γ -glutamyl S-propyl-cystéine et le γ -glutamyl 1-propenyl cystéine, composés de stockage des précurseurs soufrés augmentent également après des attaques importantes de larves d'*A. assectella* (Auger et Arnault, communication personnelle). Au regard de ces résultats, il semble donc que tous les composés impliqués dans les voies de biosynthèse des composés soufrés volatils augmentent après des attaques importantes des larves d'*A. assectella*. Ainsi l'alimentation de ce phytophage sur le poireau induit très certainement une activation de l'ensemble des voies de biosynthèse des composés soufrés par le biais notamment de l'acide jasmonique, aboutissant à une forte augmentation des composés soufrés non volatils, les alk(en)ylcystéine sulfoxides, ceci n'excluant pas des répercussions sur d'autres voies de biosynthèse non étudiées ici.

A l'instar des travaux effectués précédemment (Auger et al., 1989 ; Jaillais et al., 1999), les études en chromatographie gazeuse ont montré qu'une attaque des larves de teigne induit chez le poireau l'émission d'un spectre de composés volatils où figurent en grands nombres les thiosulfonates dégradés en di- ou tri-sulfures dans le processus chromatographique, alors qu'un poireau sain n'émet aucune odeur détectable dans nos conditions expérimentales. En revanche, le spectre de composés volatils émis lors de l'attaque ne diffère pas qualitativement d'une brisure mécanique. Cette absence de différence qualitative du bouquet de composés volatils émis par des plantes attaquées par un herbivore ou brisées mécaniquement est également rencontrée chez les solanacées, telle les plants de tomates ou les plants de pommes de terre (Bolter et al., 1997), et chez certaines crucifères (Mattiacci et al., 1994). Ces plantes qui émettent des spectres de composés volatils identiques en réponse à l'attaque d'insectes ou lors de brisures mécaniques sont généralement des plantes possédant par ailleurs des composés secondaires non volatils leur conférant un système de défense directe efficace et qui sont ainsi attaquées par un nombre limité d'insectes phytophages spécialistes (Dicke, 1999b). C'est le cas chez le poireau. Par contre, des plantes tels le maïs ou le haricot, ne produisant pas de composés secondaires non volatils susceptibles d'intervenir dans les systèmes de défense directe et qui sont de ce fait attaquées par un nombre important d'insectes généralistes (Dicke, 1999b), émettent lors de l'attaque d'insectes phytophages, un spectre de substances volatiles différent de celui émis lors de simples brisures mécaniques (Dicke et al., 1990 ; Turlings et al., 1990 ; Tumlinson et al., 1999).

Par ailleurs, une attaque prolongée et suffisamment importante de teigne du poireau, induit chez sa plante hôte une modification quantitative du spectre volatil de même qu'une augmentation globale de l'émission de composés soufrés. Ainsi l'augmentation des concentrations des précurseurs soufrés lors de l'attaque peut entraîner une émission plus importante de substances soufrées chez le poireau attaqué. Les spectres de volatils émis par un poireau brisé mécaniquement et un poireau attaqué diffèrent alors quantitativement. De la même façon, les plants de choux de Bruxelles, *Brassicae oleracea*, lors d'une attaque suffisamment importante de chenilles de *Pieris rapae*, émettent un bouquet de substances volatiles qui diffère d'une coupure mécanique par la quantité de composés à « odeur vertes » (Mattiacci et al., 2001a).

Il apparaît donc au cours de cette étude, que l'attaque des larves d'*A. assectella*, induit chez le poireau une réponse se traduisant par une augmentation de la production de substances soufrées non volatiles, augmentation pouvant alors aboutir lors d'une nouvelle blessure ou attaque de la plante à un accroissement des composés volatils émis.

Nous étudierons donc lors du chapitre suivant qu'elles peuvent être les conséquences de ces modifications de la concentration des métabolites soufrés sur les insectes satellites du poireau.

CHAPITRE 5 :

CONSEQUENCES DE LA REPONSE INDUITE CHEZ LE POIREAU SUR LES INSECTES SATELLITES

5.1/ Introduction

Chez de nombreux végétaux, comme déjà évoqué en introduction générale notamment, l'attaque d'insectes phytophages aboutit à la mise en place d'une réponse induite pouvant représenter pour la plante un système de défense directe (Karban et Baldwin, 1997 ; Agrawal, 1999) ou un système de défense indirecte (Takabayashi et Dicke, 1996 ; Dicke, 1999a et b ; Paré et Tumlinson, 1999).

Les systèmes de défense induite directe vont avoir des conséquences immédiates sur le comportement et/ou les capacités de développement des insectes phytophages. Ainsi les larves du lépidoptère généraliste *Spodoptera exigua* évitent de se développer sur un cotonnier préalablement attaqué par des congénères (McAuslane et Alborn, 2000). Ces auteurs ont observé également que lorsque ces larves sont contraintes de se développer sur des plantes attaquées, elles présentent une mortalité plus élevée, les chrysalides sont moins lourdes et la durée de développement des individus est allongée.

Les défenses induites indirectes sont généralement observées lorsqu'une plante attaquée émet un spectre de composés volatils différent de celui émis par des plantes non attaquées et qui provoque l'attraction des ennemis naturels de l'herbivore (Turlings et al., 1990). La présence des ennemis naturels, par prédation ou parasitisme de l'espèce phytophage, peut alors avoir des conséquences positives sur la fitness de la plante (van Loon et al., 2000).

Il a été mis en évidence lors du chapitre précédent que sous certaines conditions d'attaques par la teigne du poireau, *Acrolepiopsis assectella*, le poireau développe une réponse induite qui se traduit par l'augmentation de la concentration des précurseurs soufrés dans l'ensemble de la plante mais également par une modification du spectre de composés volatils, et une augmentation globale des substances soufrées émises. Cette réponse induite pourrait peut être représenter un système de défense pour le poireau. Cependant, les études effectuées précédemment au laboratoire ont montré que les substances soufrées des *Allium* avaient une influence positive sur le comportement ou le développement du spécialiste, la teigne du poireau. Ainsi les composés soufrés sont attractifs pour les adultes (Thibout et al., 1982), phagostimulants pour les larves (Al-Rouz et Thibout, 1989), et leurs séquestrations permet aux larves de se protéger des prédateurs généralistes (Nowbahari et Thibout, 1991 ; Leroux et al., 2002). De plus les tests de toxicité réalisés précédemment (cf. chapitre 1) ont montré que les larves de teigne sont

beaucoup moins sensibles que les autres espèces aux composés soufrés volatils. Ces différentes études semblent donc indiquer que les teignes sont parfaitement adaptées à la chimie soufrée de leur plante hôte et que ces substances soufrées auraient une influence positive sur le comportement et les capacités de développement de ce phytophage spécialiste. D'autres études ont montré que des insectes spécialistes, utilisant également les composés secondaires à leur propre profit pouvaient néanmoins être fortement affectés par de telles substances (Berenbaum et al., 1989 ; Adler et al., 1995). Ainsi, les capacités de développement des larves du spécialiste *Pieris rapae* sont fortement réduites lorsqu'elles se développent sur des plantes hôtes qui ont été préalablement attaquées par des congénères (Agrawal, 2000a ; Agrawal et Kurashige, 2003).

Dans cette étude, les conséquences de la réponse induite chez le poireau, sur le comportement et les capacités de développement de la teigne du poireau seront analysées. Pour cela, le comportement alimentaire des larves de teigne sera analysé en situation de choix sur des poireaux sains et sur des poireaux dits attaqués, c'est à dire qu'ils auront été attaqués au préalable par des congénères. De la même façon, le comportement de ponte des femelles sera étudié en situation de choix sur des poireaux sains et sur des poireaux attaqués en s'affranchissant ou non de l'influence des substances volatiles sur ce comportement. Sera également analysé, la capacité de développement de cet insecte sur des poireaux sains et attaqués. Ces différentes études permettront donc d'estimer si la réponse induite chez le poireau peut être considérée comme un système de défense directe induite contre la teigne du poireau.

Lors du chapitre précédent, il a également été mis en évidence que la réponse induite chez le poireau se traduit par une augmentation de l'émission des substances soufrées volatiles, ce qui pourrait indiquer la présence d'un hôte potentiel pour l'hyménoptère parasitoïde *Diadromus pulchellus*, spécialiste des chrysalides de teigne du poireau. De plus, les expériences réalisées précédemment au laboratoire ont montré que les substances volatiles soufrées des *Allium* intervenaient dans le comportement de recherche de l'hôte chez cet hyménoptère (Lecomte et Thibout, 1984 ; 1986). Ainsi, lors d'expériences en tunnel de vol, nous analyserons l'influence de la réponse induite chez le poireau sur le comportement de recherche de l'hôte par *D. pulchellus*. La réponse induite chez le poireau pourrait alors représenter également un système de défense indirecte pour la plante.

5.2/ Matériels et Méthodes

a) Matériel biologique

a₁) Le poireau

Les plants de poireau (variété Parlton) utilisés dans cette étude proviennent du CTIFL de Carquefou, comme indiqué précédemment. Ils sont âgés d'environ 6 mois et possèdent un diamètre de fût d'environ 2 cm. Les plants sont transplantés dans des pots de 10 cm de diamètre et sont maintenus en serre jusqu'à leur utilisation pour les expériences, 4 à 8 semaines après la transplantation.

a₂) Le lépidoptère phytophage

Le phytophage utilisé pour cette étude est la teigne du poireau, *A. assectella*, déjà présentée dans les chapitres précédents.

a₃) L'hyménoptère parasitoïde (fig. 51)

** Biologie sommaire de l'insecte*

L'hyménoptère parasitoïde utilisé dans cette étude est *D. pulchellus*. Cet insecte est un Ichneumonidae endoparasitoïde solitaire des chrysalides d'*A. assectella*, présentant une reproduction sexuée et une parthénogenèse arrhénotoque. D'après la littérature, cet hyménoptère serait un spécialiste strict de la teigne du poireau (Labeyrie, 1960 ; Rojas-Rousse, 1980 ; Kalmès, 1984) même si en condition de laboratoire il peut parasiter les chrysalides de teignes du chou, *Plutella xylostella* (Thibout, 1988). Cette espèce semble avoir une aire de répartition limitée aux régions tempérées, avec une localisation plutôt atlantique (Kalmès, 1984).



Fig. 51: Femelle de *D. pulchellus* s'apprêtant à parasiter une chrysalide d'*A. assectella* (cliché F Bénédet).

* Conditions d'élevage

La souche de *D. pulchellus* est élevée au laboratoire et renouvelée partiellement chaque année par captures d'individus dans un champ de poireau. La souche maintenue en cage dans une pièce climatisée, est élevée sur les chrysalides de la teigne du poireau. Les conditions de thermopériodes, de photopériodes et d'humidité relative (HR) sont de 25°C, 70 \pm 10 % HR durant les 16 h de lumière et 17°C, 70 \pm 10 % HR durant les 8 h d'obscurité. Des chrysalides d'*A. assectella*, âgées de 24 h, sont proposées chaque jour aux femelles fécondées de *D. pulchellus* pour la ponte. Les adultes émergent 3 semaines environ après la ponte.

b) Méthodes expérimentales

b₁) Etude du comportement alimentaire et du comportement de ponte chez *A. assectella*.

L'étude du comportement alimentaire et du comportement de ponte chez *A. assectella* a été réalisée de façon comparative sur des poireaux sains et sur des poireaux préalablement attaqués de telle sorte que ces poireaux aient pu mettre en place la réponse induite observée dans le chapitre précédent. Le postulat de départ de cette étude est donc que les poireaux attaqués possèdent globalement des concentrations de précurseurs soufrés supérieures aux poireaux sains.

Le dispositif expérimental est constitué d'une boîte de Pétri transformée pour les besoins de l'expérience. Pour réaliser cette enceinte, quatre entailles ont été percées sur les bords de la boîte de manière à pouvoir y glisser parallèlement deux feuilles de poireau, une feuille issue d'un poireau sain et une feuille issue d'un poireau attaqué. L'enceinte est ainsi divisée en deux parties équivalentes, l'une contenant la feuille issue d'un poireau sain et l'autre la feuille issue d'un poireau attaqué (fig. 52 a & b).

Lors de ces expériences, les substances volatiles soufrées n'ont très certainement que peu d'influence car les feuilles proposées aux femelles à l'intérieur du dispositif sont intactes, toujours reliées à leur poireau d'origine et n'émettent donc que peu ou pas de substances volatiles. Par ailleurs, l'enceinte étant close, par suite de diffusion, aucun gradient d'odeur ne doit exister. Donc, seules les substances pouvant être détectées par contact, tels les précurseurs soufrés, auront une influence dans nos conditions expérimentales.

Ces expérimentations sont réalisées dans des conditions de photopériode, de thermopériode et d'hygrométrie identiques à celles de la salle d'élevage.

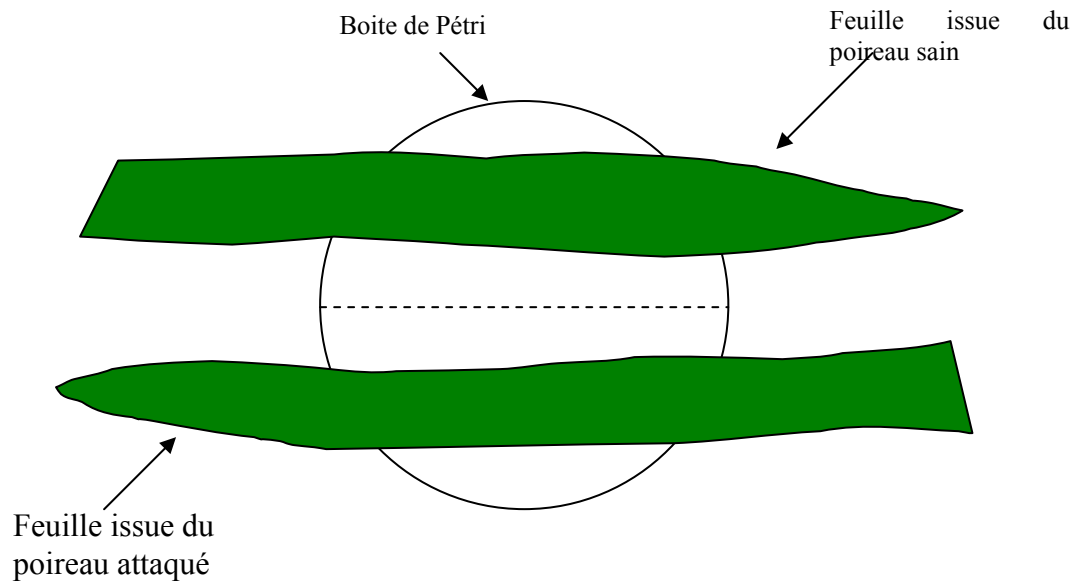


Fig. 52a: Schéma du dispositif expérimental utilisé pour l'étude du comportement alimentaire et du comportement de ponte d'*A. assectella* en enceinte close.

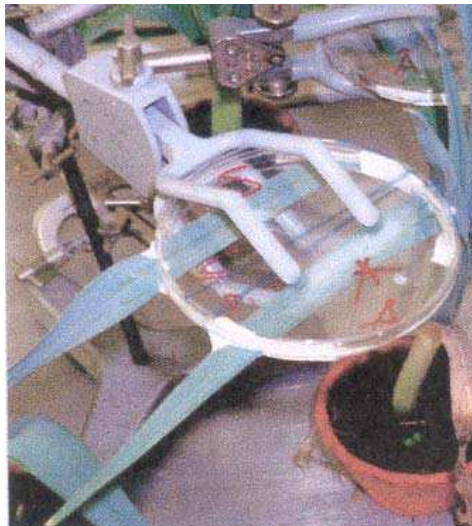


Fig. 52b: Dispositif expérimental pour l'étude du comportement alimentaire et du comportement de ponte d'*A. assectella* en enceinte close.

- Etude du comportement alimentaire

Une larve de stade L_4 est déposée au centre d'une enceinte identique à celle précédemment décrite, à égale distance des 2 feuilles. Toutes les issues potentielles sont ensuite obstruées au moyen de coton, de film étirable et de ruban adhésif pour éviter la fuite de l'individu. La larve sera enlevée 24 h après son introduction et pour chacune des deux feuilles la longueur totale consommée par la larve est mesurée, la larve consommant la feuille de façon rectiligne, parallèlement aux nervures du végétal. Pour cette expérience, 83 répétitions ont été effectuées.

- Etude du comportement de ponte

- *Influence des stimulus de contact*

Les individus des deux sexes sont préalablement séparés et isolés au début du stade nymphal. Des couples sont formés 24 h après l'émergence des adultes et le lendemain la femelle est déposée au centre de l'enceinte expérimentale précédemment décrite. Le nombre d'œufs pondus sur chaque feuille est compté 24 h après l'introduction de la femelle. Seules sont retenues les répétitions où les femelles ont pondu, l'absence de ponte étant souvent liée à un manque d'accouplement préalable (Thibout, 1974). Pour cette expérience, 75 répétitions ont été effectuées.

- *Influence des stimulus volatils*

Pour tester l'influence des composés volatils émis par des poireaux ayant été attaqués ou non préalablement, sur le comportement de ponte d'*A. assectella*, une série d'expériences en tunnel de vol a été réalisée.

La partie expérimentale du tunnel est un parallélépipède rectangle en plexiglas de 1,40 m de long avec une section carré de 0,40 m de côté. A la partie amont se situe la soufflerie permettant l'émission d'un courant d'air continu réglé à la vitesse de $0,2 \text{ m.s}^{-1}$. A la sortie du tunnel se trouve un extracteur permettant de véhiculer le flux odorant vers l'extérieur. Les deux plants de poireaux, l'un attaqué l'autre non, sont disposés à l'entrée du tunnel de vol et seront changés de côté après chaque série d'expériences (fig. 53). Les femelles fécondées âgées de deux jours sont lâchées par groupe de 5 à la sortie du tunnel et sont laissées à l'intérieur du dispositif pendant toute la période nocturne, période pendant laquelle les pontes sont généralement

effectuées (Dakkouni, 1982). Les œufs pondus sur chaque poireau sont comptés le lendemain.

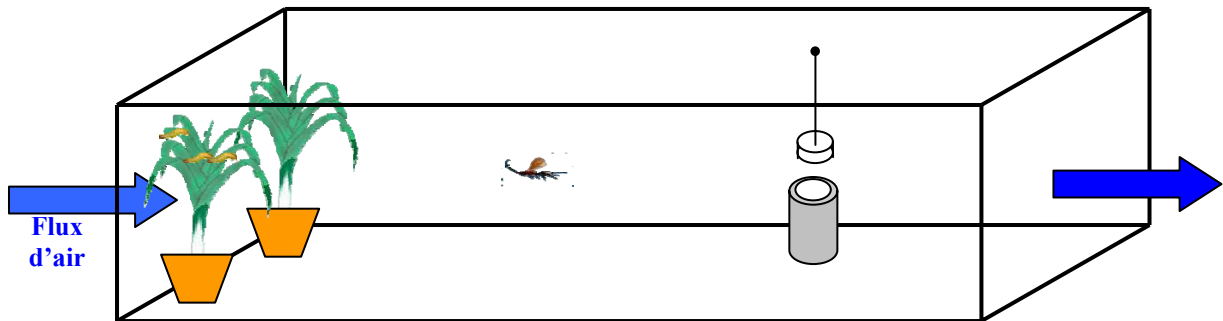


Fig. 53: Description schématique du tunnel de vol utilisé pour l'étude du comportement de ponte d'*A. assectella* et pour l'étude du comportement de recherche de l'hôte par *D. pulchellus*.

Pour cette série d'expériences, deux modalités d'attaques ont été étudiées, une attaque dite « faible », c'est à dire 5 larves pendant 8 jours et une attaque dite « forte », 15 larves pendant 8 jours. Pour chaque modalité d'attaque, 6 groupes de 5 femelles fécondées sont utilisés.

Précisons que dans cette série d'expériences, les stimulus de contact ne sont pas absents mais agissent avec les stimulus volatils.

b₂) Etude du développement chez *A. assectella*.

De la même façon que pour les séries d'expériences précédentes, l'étude du développement chez *A. assectella* a été réalisée de façon comparative sur des poireaux sains et sur des poireaux préalablement attaqués. Ainsi l'attaque initiale a été réalisée à l'aide de 15 larves pendant 8 jours de manière à déclencher la réponse induite chez la plante observée lors du chapitre 4.

Le développement des teignes sur les poireaux attaqués ou non est suivi depuis le dépôt de l'œuf jusqu'à l'émergence des adultes. Des morceaux de plastique préalablement enduits d'exsudats de poireau stimulant l'oviposition (Arnault, 1982), sont placés dans la cage d'élevage durant 24 h. Après ce délai les plastiques contenant les œufs sont récupérés puis découpés par morceaux regroupant 3 œufs chacun. Deux

morceaux, soit 6 œufs sont déposés par poireau. Le retrait des plastiques et la vérification de l'éclosion des œufs sont effectués sous loupe binoculaire 6 jours après le dépôt (au delà de ce délai, les œufs non éclos sont considérés comme morts). Un œuf éclos est reconnaissable à sa couleur transparente et au trou de perforation à sa surface. Les larves effectuent ensuite tout leur développement sur le poireau et les chrysalides sont récoltées le jour de leur apparition. Les chrysalides à l'intérieur de leur cocon sont pesées 4 jours après, ce délai permettant une diminution des variations de poids dues aux pertes d'eau. Après la pesée, les chrysalides sont isolées jusqu'à l'émergence des adultes. Le jour de leur émergence, les femelles sont disséquées pour permettre le dénombrement des ovocytes chorionnés dans les ovarioles. L'intérêt de cette dissection le jour de l'émergence est que les femelles n'ont pas eu le temps d'être stimulées par des facteurs externes, le nombre d'ovocytes ne dépend donc que des conditions de développement larvaire.

Ainsi, peuvent être analysés le poids des chrysalides dans leur cocon, la durée de développement du stade œuf jusqu'à l'émergence, le taux de mortalité larvaire et la fécondité potentielle des femelles chez des individus ayant réalisé leur développement sur des poireaux attaqués ou non.

b₃) Etude du comportement de recherche de l'hôte par *D. pulchellus*.

Les parasitoïdes utilisés pour ces expériences sont des femelles âgées de 4 à 5 jours, âge auquel la réponse aux composés secondaires soufrés des *Allium* est la plus importante (Rojas-Rousse, 1980). Ces femelles sont isolées dès leur émergence et aussitôt accouplées avec des mâles préalablement isolés âgés de 4 jours. Une fois fécondées, les femelles sont placées dans la pièce climatisée où s'effectueront les expériences par la suite. Depuis l'émergence, elles sont nourries avec de l'eau sucrée et ne sont jamais en contact avec le poireau ou l'odeur de celui-ci.

Les plantes utilisées sont des poireaux âgés de 6 mois, comme décrit dans le chapitre précédent. La préparation des poireaux avant l'expérience sera détaillée dans la partie « Résultats » ainsi que dans les légendes des figures.

Les expériences sont réalisées dans le tunnel de vol décrit précédemment, en début d'après midi, dans une pièce climatisée où règnent les mêmes conditions de thermopériode, photopériode et hygrométrie que dans la salle d'élevage.

Le comportement de recherche de l'hôte par les femelles de *D. pulchellus* est analysé en situation de choix ; deux poireaux leur sont toujours proposés. Les deux

plantes sont placées à l'extrémité amont du tunnel, l'une à côté de l'autre, mais les feuilles des deux plantes ne se touchent pas. Après 5 répétitions, les plantes sont changées de côté pour éviter un biais lié à une possible dissymétrie latérale. Chaque femelle est placée à l'extrémité aval du tunnel à l'intérieur d'une boîte de Pétri. Un système relié par du fil de nylon à l'extérieur du dispositif permet l'ouverture de la boîte sans perturber la femelle (fig. 53). Un flux d'air réglé à $0,20 \text{ m.s}^{-1}$ à l'aide d'un anémomètre, véhicule les molécules odorantes émises par les plantes. L'expérience est arrêtée, lorsque la femelle a effectué un choix, c'est à dire lorsqu'elle a atteint un des deux poireaux et qu'elle commence une phase de prospection antennaire supérieure à 30 secondes. Si après 5 minutes d'expérience, aucun choix n'est effectué par la femelle, nous considérons que celle-ci n'a été attirée par aucun des deux poireaux proposés. Trois séries d'expériences décrites dans la partie « Résultats » seront réalisées. Pour chaque série d'expérience, une soixantaine de femelles sera utilisée.

c) Analyses statistiques

Après analyse de la normalité des échantillons par un test de Kolmogorov et comparaison des variances par un test de Fisher, les moyennes seront comparées par un test t de Student pour données appariées ou indépendantes. Les effectifs sont comparés par un test de Khi^2 (χ^2).

Les données sont d'abord testées au seuil $\alpha = 0,05$ (*) puis éventuellement au seuil $\alpha = 0,01$ (**) et $\alpha = 0,005$ (**).

5.3/ Résultats

a) Influence de la réponse induite chez le poireau sur le comportement alimentaire d'*A. assectella*

L'étude du comportement de nutrition des larves d'*A. assectella* montre qu'il n'y pas de différence significative de quantité de poireau consommée entre des poireaux sains ou des poireaux attaqués (fig. 54a ; $t = 1,398$; $P = 0,083$). Les larves de teigne, en situation de choix, ne semblent donc pas consommer plus de surface de poireau sain ou de poireau préalablement attaqué.

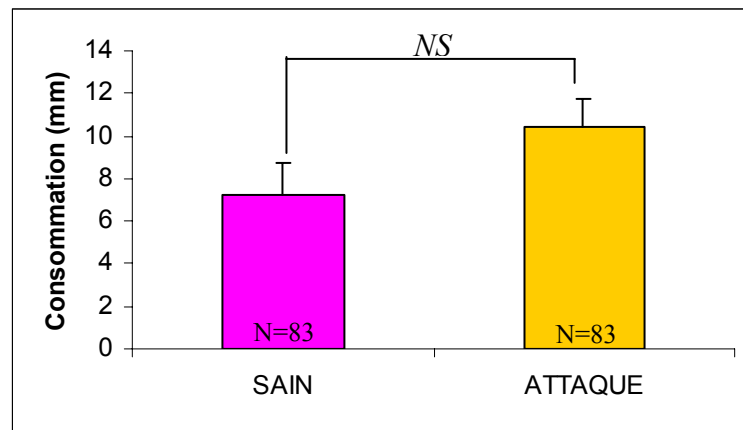


Fig. 54a: Moyenne (\pm SE) de la longueur de la mine traduisant la quantité de végétal consommé par les larves d'*A. assectella* sur un poireau sain ou sur un poireau préalablement attaqué par 15 larves pendant 8 jours ($P = 0,083$).

En revanche, l'observation du nombre de fois où l'un ou l'autre des deux poireaux a été consommé plus que l'autre, révèle que les larves de teigne ont une tendance significative à consommer plus souvent le poireau préalablement attaqué (fig. 54b ; $\chi^2 = 6,37 > 3,84$; $P < 0,05$; 1 ddl). Sur un total de 83 individus, 50 larves ont consommé davantage de végétal sur le poireau préalablement attaqué.

Les larves de teigne ont donc tendance à se nourrir davantage aux dépens des poireaux préalablement attaqués, bien que la quantité moyenne consommée ne soit pas différente entre les deux lots de poireaux.

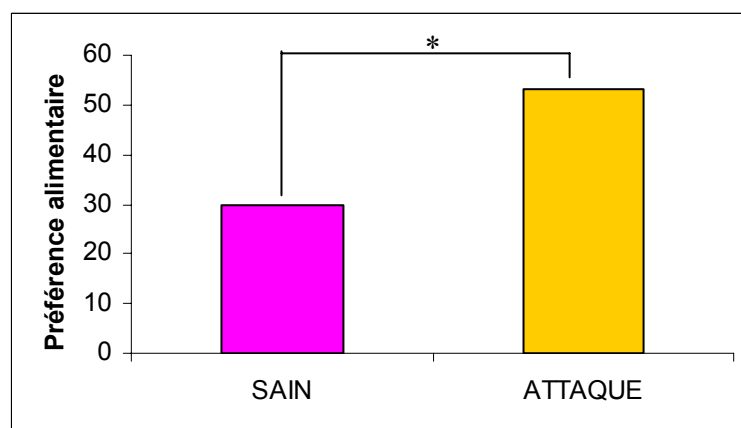


Fig. 54b: Nombre de larves d'*A. assectella* ayant consommé plus de surface végétale sur l'un ou l'autre poireau ($\chi^2 = 6,37 > 3,84$; $P < 0,05$).

b) Influence de la réponse induite chez le poireau sur le comportement de ponte d'*A. assectella*

- Influence des stimulus de contact*

L'observation du comportement de ponte montre que le nombre d'œufs moyen pondus par femelle sur le poireau attaqué, $33,1 \pm 2,8$ est significativement supérieur au nombre d'œufs moyen pondus par femelle sur le poireau sain, $25,1 \pm 2,1$ (fig. 55a ; $t = 2,75$; $P = 0,004$).

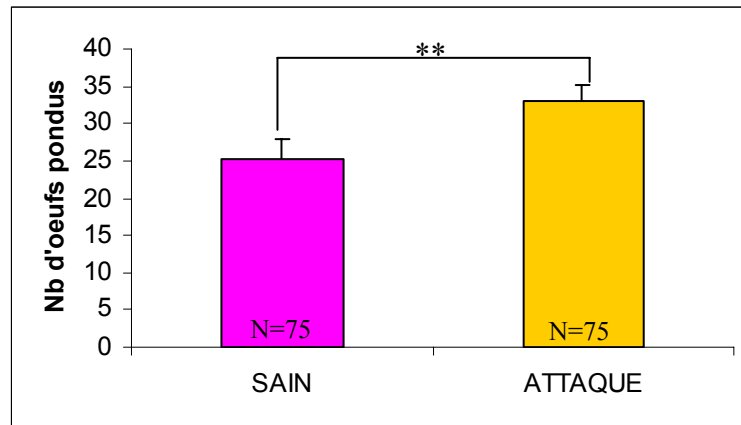


Fig. 55a: Moyenne (\pm SE) du nombre d'œufs pondus par femelle d'*A. assectella* sur un poireau sain ou sur un poireau préalablement attaqué par 15 larves pendant 8 jours, en enceinte close ($P = 0,004$).

De plus, sur un total de 75 individus, 48 femelles pondent significativement plus d'œufs sur le poireau préalablement attaqué (fig. 55b ; $\chi^2 = 5,88 > 3,84$; $P < 0,05$; 1 ddl).

Il semble donc que dans nos conditions expérimentales en absence d'influence des composés volatils soufrés, les femelles d'*A. assectella* pondent préférentiellement sur les poireaux préalablement attaqués.

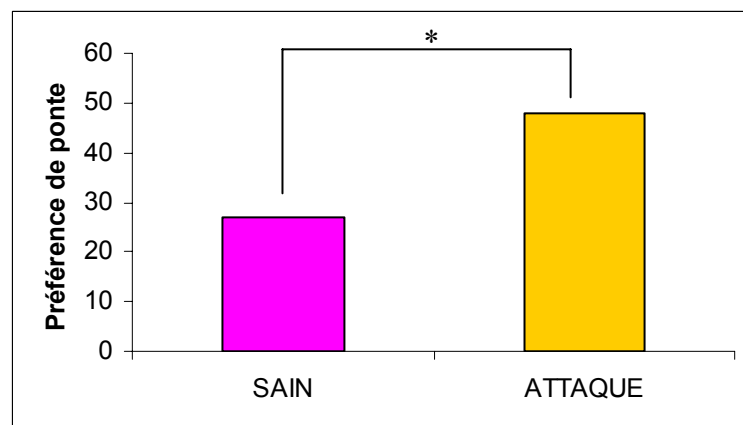


Fig. 55b: Nombre de femelles de *A. assectella* ayant pondus plus d'œufs sur l'un ou l'autre poireau ($\chi^2 = 5,88 > 3,84$; $P < 0,05$).

- *Influence des stimulus volatils*

En situation de choix, en présence d'un poireau sain et d'un poireau faiblement attaqué (5 larves pendant 8 jours), les femelles de teignes du poireau testées par groupe de 5 pondent significativement plus d'œufs sur le poireau attaqué (fig. 56 ; $t = 4,153$; $P = 0,004$).

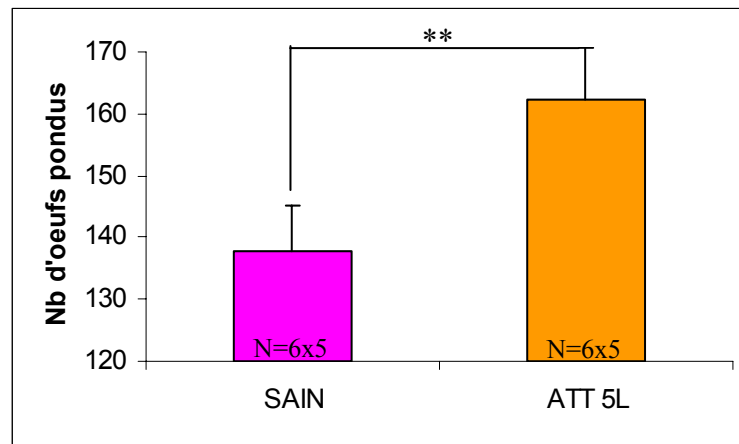


Fig. 56: Moyenne (\pm SE) du nombre d'œufs pondus par un groupe de 5 femelles d'*A. assectella* sur un poireau sain ou sur un poireau attaqué par 5 larves pendant 8 jours, en tunnel de vol ($P = 0,004$).

En revanche, lorsque l'attaque est de plus forte intensité (15 larves pendant 8 jours), la différence d'œufs pondus sur le poireau sain ou sur le poireau attaqué n'est pas significative (fig. 57 ; $t = 0,648$; $P = 0,273$).

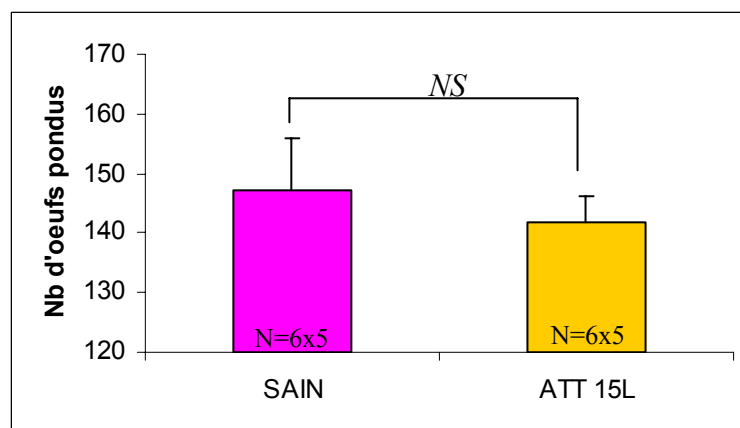


Fig. 57: Moyenne (\pm SE) du nombre d'œufs pondus par un groupe de 5 femelles d'*A. assectella* sur un poireau sain ou sur un poireau attaqué par 15 larves pendant 8 jours, en tunnel de vol ($P = 0,273$).

Le choix du site de ponte des femelles d'*A. assectella* est donc orienté vers le poireau attaqué lorsque celui-ci ne l'est que faiblement, ce choix disparaissant en présence d'un poireau plus fortement attaqué.

c) Influence de la réponse induite chez le poireau sur le développement d'*A. assectella*

Le suivi du développement des teignes sur des poireaux préalablement attaqués, a permis d'analyser des composantes importantes de la fitness des individus.

- *Analyse du poids des individus*

Chez les lépidoptères, le poids de la chrysalide est un indicateur intéressant de la qualité de la plante hôte sur laquelle s'est développée la chenille. Les pesées réalisées sur des chrysalides de 4 jours révèlent qu'il n'y a pas de différence significative de poids, au sein d'un même sexe, entre des individus ayant réalisé leur développement larvaire sur un poireau attaqué ou non (fig. 58). En effet, le poids moyen des chrysalides mâles issues des poireaux attaqués est de $7,7 \pm 0,8$ mg et n'est pas significativement différent de celui des chrysalides mâles issues de poireaux sains, $7,6 \pm 0,6$ mg ($P = 0,695$). De même, le poids moyen des chrysalides femelles issues des poireaux attaqués est de $8,8 \pm 0,9$ mg et n'est pas significativement différent de celui des chrysalides femelles issues des poireaux sains, $9,1 \pm 0,9$ mg ($P = 0,204$).

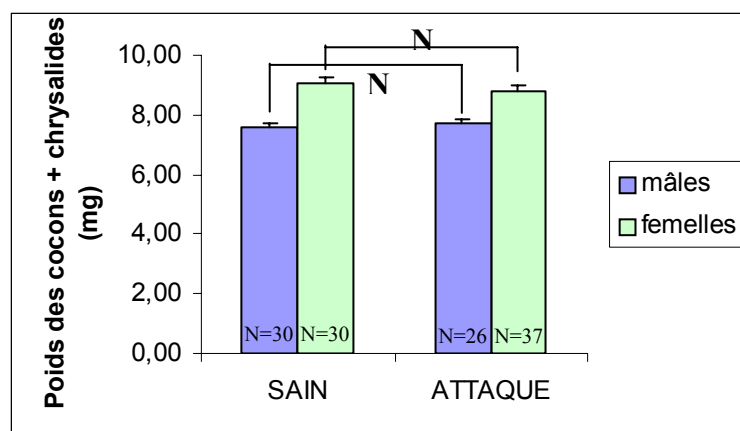


Fig. 58: Moyenne (\pm SE) du poids des chrysalides d'*A. assectella* mâles et femelles dans leur cocon s'étant développées sur poireau sain ou sur poireau préalablement attaqué par 15 larves pendant 8 jours ($P_{\text{♂}} = 0,695$; $P_{\text{♀}} = 0,204$).

La réponse induite du poireau n'a donc pas d'influence notable sur le poids des chrysalides de la teigne dans nos conditions expérimentales.

- *Analyse de la durée de développement*

La durée de développement d'un insecte, de la ponte de l'œuf au stade imago est également une composante importante de la fitness d'un individu.

La durée de développement des individus mâles issus de poireaux attaqués est de $28,7 \pm 2,2$ jours et est significativement plus longue que la durée de développement des mâles issus des poireaux sains qui est de $27,5 \pm 1,3$ jours (fig. 59 ; $t = 2,421$; $P = 0,017$). En revanche, les femelles issues de poireaux attaqués ont une durée de développement de $29,1 \pm 2,0$ jours, non significativement différente de celle des femelles issues des poireaux sains qui est de $28,4 \pm 1,6$ jours (fig. 59 ; $t = 1,474$; $P = 0,140$).

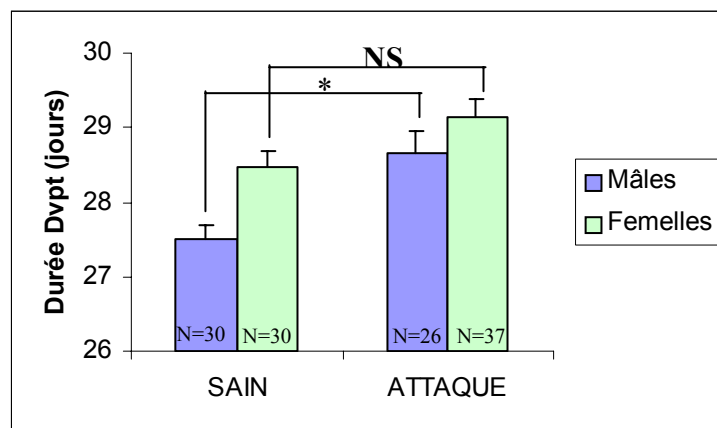


Fig. 59: Moyenne (\pm SE) de la durée de développement d'individus mâles et femelles d'*A. assectella* issus d'un poireau sain ou d'un poireau préalablement attaqué par 15 larves pendant 8 jours ($P_{\sigma} = 0,017$; $P_{\varphi} = 0,140$).

La réponse induite chez le poireau augmente donc légèrement la durée de développement des individus mâles mais n'a pas d'influence sur la durée de développement des individus femelles.

- *Analyse de la mortalité larvaire*

Le taux de mortalité larvaire a été calculé comme étant la différence entre le nombre d'œufs éclos et le nombre de chrysalides récupérées. Sont ainsi comptabilisées comme mortes les larves qui se sont échappées du poireau avant la nymphose, ce qui pourrait expliquer les valeurs relativement élevées des taux de mortalité observés. Il n'y a pas de différence significative de mortalité entre les larves ayant effectuées leur développement sur l'un ou l'autre poireau (fig. 60 ; $\chi^2 = 1,01 < 3,84$; $P > 0,05$; ddl 1).

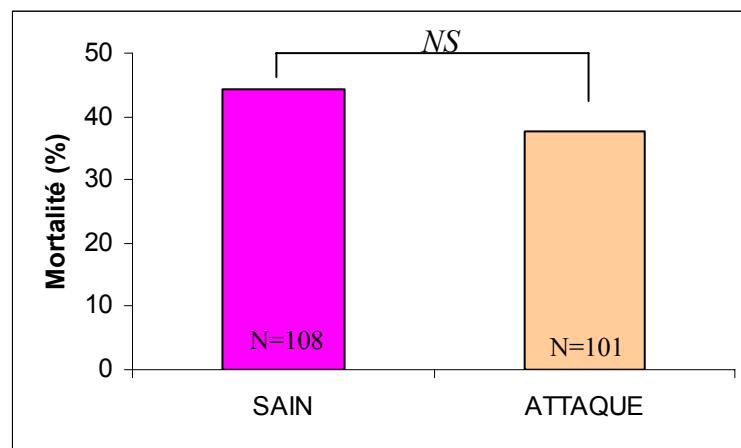


Fig. 60: Pourcentage de mortalité des larves d'*A. assectella* se développant sur un poireau sain ou sur un poireau préalablement attaqué par 15 larves pendant 8 jours ($\chi^2 = 1,01 < 3,84$; $P > 0,05$).

La réponse induite chez le poireau ne provoque donc pas dans nos conditions expérimentales, une augmentation du taux de mortalité des individus.

- *Analyse de la fécondité potentielle des femelles*

La dissection de l'abdomen des femelles obtenues à l'issue de cette expérience a permis l'observation du nombre d'ovocytes chorionnés dans les ovarioles, reflet de leur fécondité potentielle à l'émergence. Les individus issus des poireaux attaqués possèdent en moyenne $79,9 \pm 13,1$ ovocytes chorionnés, alors que les individus issus de poireaux sains possèdent un nombre d'ovocytes significativement supérieur qui est de $96,1 \pm 15,1$ (fig. 61 ; $t = 4,641$; $P < 0,003$).

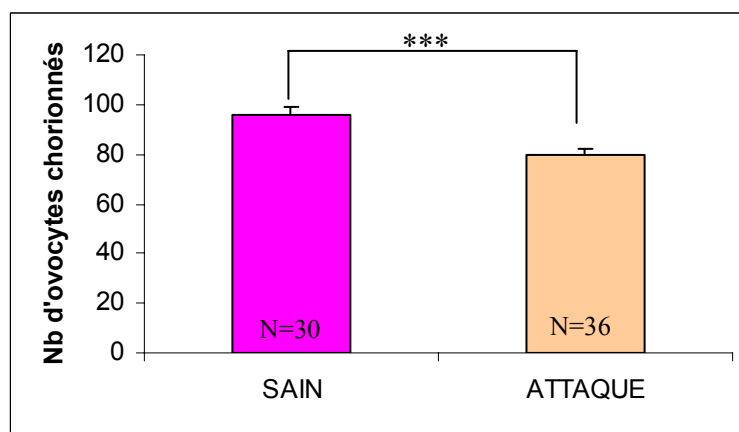


Fig. 61: Moyenne (\pm SE) du nombre d'ovocytes chorionnés dans les ovarioles de femelles d'*A. assectella* issues d'un poireau sain ou d'un poireau préalablement attaqué par 15 larves pendant 8 jours ($P < 0,003$).

La réponse induite du poireau provoque donc une diminution importante de la fécondité potentielle des femelles.

d) Influence de la réponse induite chez le poireau sur le comportement de recherche de l'hôte par *D. pulchellus*

- *Attraction par : poireau sain Vs poireau attaqué*

Le comportement des femelles de *D. pulchellus* a tout d'abord été étudié en présence d'un poireau sain et d'un poireau sur lequel 15 larves L₃-L₄ ont été déposées 8 jours auparavant, certaines de ces larves se sont nymphosées et d'autres continuent de se nourrir sur la plante qui émet ainsi des composés volatils caractéristiques du poireau attaqué et des fèces larvaires. Parmi les 57 femelles utilisées pour cette expérience, 37 ont effectué un choix (soit 65% des individus), dont 31 atterrissent sur le poireau attaqué et 6 sur le poireau sain (fig. 62). Dans nos conditions expérimentales, les femelles de *D. pulchellus* sont significativement plus attirées par le poireau attaqué que par le poireau sain ($\chi^2 = 8,44 > 7,88$; $P < 0,005$; 1 ddl).

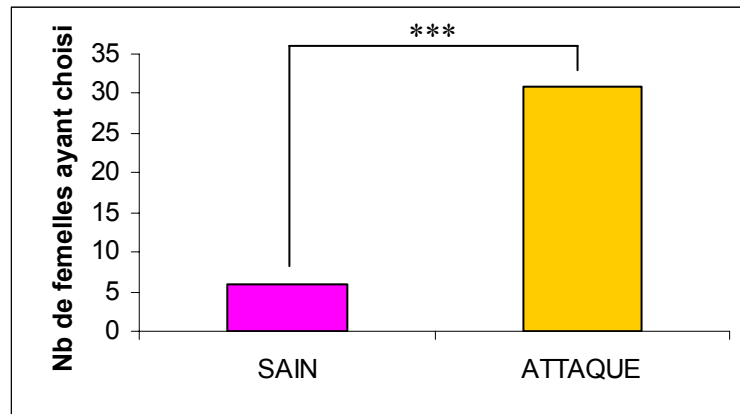


Fig. 62: Nombre de femelles de *D. pulchellus* ayant choisi le poireau sain ou le poireau attaqué par 15 larves d'*A. assectella* pendant 8 jours ($\chi^2 = 8,44 > 7,88$; $P < 0,005$).

- *Attraction par : poireau sain Vs poireau sain + fèces*

Lors de l'expérience suivante, deux poireaux sains sont utilisés, mais sur l'un des deux, des fèces fraîches étaient rajoutées. Parmi les 61 femelles utilisées, 35 ont effectué un choix (soit 57% des individus), dont 26 ont atterri sur le poireau sur lequel des fèces ont été rajoutées et 9 sur le poireau sain sans fèces (fig. 63). Un poireau sain badigeonné de fèces est donc significativement plus attractif qu'un poireau sain sans fèces pour les femelles de *D. pulchellus* ($\chi^2 = 5,46 > 3,84$; $P < 0,05$; 1 ddl).

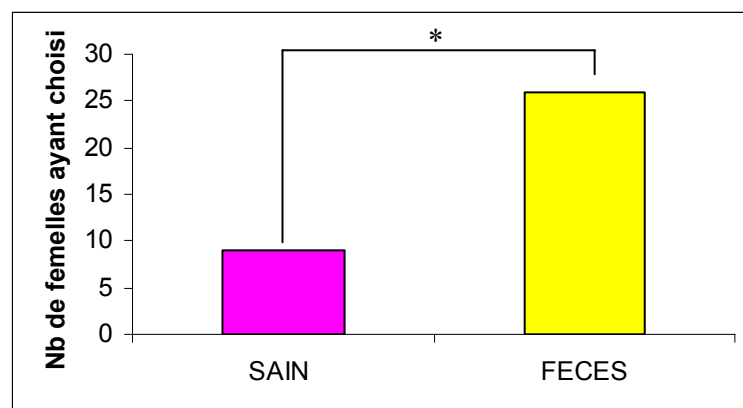


Fig. 63: Nombre de femelles de *D. pulchellus* ayant choisi le poireau sain ou le poireau sain + fèces ($\chi^2 = 5,46 > 3,84$; $P < 0,05$).

- *Attraction par : poireau sain + coupures Vs poireau attaqué – fèces + coupures*

Enfin, l'attraction du parasitoïde a été étudiée en présence de deux poireaux, l'un sain, l'autre préalablement attaqué par 15 larves pendant 8 jours mais dont les larves et leurs fèces ont été retirées la veille de l'expérience. Une feuille de chacun des deux poireaux est coupée méthodiquement au ciseau, à raison de 10 coupures de 1 cm de long, juste avant le début de l'expérience. Soixante-trois femelles ont été testées, 31 ont effectué un choix (soit 49% des individus), dont 19 ont choisi le poireau préalablement attaqué et 12 le poireau sain (fig. 64). Cette différence n'est pas significative ($\chi^2 = 1,58 < 3,84$; $P > 0,05$; ddl 1), il n'y a donc pas de choix préférentiel pour l'un ou l'autre poireau dans ces conditions.

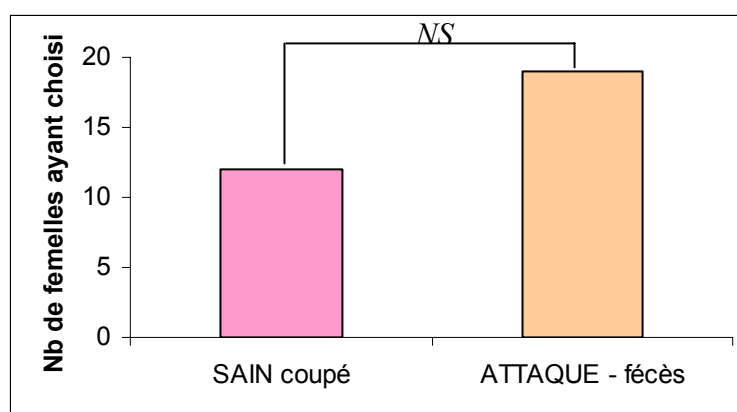


Fig. 64: Nombre de femelle ayant choisi le poireau sain coupé ou le poireau coupé et préalablement attaqué mais lavé de toutes traces de fèces ($\chi^2 = 1,58 < 3,84$; $P > 0,05$).

5.4/ Discussion

Cette étude a permis l'analyse des conséquences de la réponse induite chez le poireau sur le comportement et les capacités de développement de l'insecte phytophage spécialiste, la teigne du poireau et sur le comportement de recherche de l'hôte par son principal ennemi naturel, le parasitoïde *D. pulchellus*.

Les effets de l'augmentation de la concentration en précurseurs soufrés et la modification du bouquet de composés volatils émis chez les poireaux préalablement

attaqués sur le phytophage, semblent à première vue donner des résultats contrastés concernant la défense de la plante vis-à-vis de cet insecte. Globalement, le comportement des teignes est positivement affecté par la réponse de la plante alors que leur développement est perturbé et ne s'effectue pas de la même façon sur une plante saine et sur une plante attaquée.

En situation de choix, les larves de teigne ont tendance à se nourrir davantage aux dépens d'un poireau préalablement attaqué plutôt qu'aux dépens d'un poireau exempt de toute attaque. Cette préférence pourrait être le fait de la plus forte concentration en PCSO dans les feuilles du poireau attaqué (cf. chapitre 4), cette substance ayant par ailleurs été démontrée comme étant phagostimulante pour les larves de la teigne du poireau (Al Rouz et Thibout, 1989). La réponse induite de la plante a donc un effet positif sur le comportement alimentaire du phytophage. De la même façon, contrairement à de nombreux systèmes plante-phytophage (Anderson et al., 2001 ; Srinivas et al., 2001 ; Thaler et al., 2001 ; Agrell et al., 2003), la réponse induite chez la plante provoque un accroissement de la prise alimentaire chez certains insectes spécialistes, tel *Delia radicum* ou *P. brassicae* (Baur et al., 1996 ; Mattiacci et al., 2001b). Cependant, l'effet positif de la réponse induite du poireau sur la prise alimentaire des larves de teigne doit être relativisé. En effet, la préférence alimentaire pour le poireau préalablement attaqué ne se traduit pas par une augmentation de la surface végétale consommée par l'insecte. De plus, l'expérience de choix a été réalisée en présence de feuilles vertes de la plante dans lesquelles l'induction de l'augmentation des précurseurs soufrés semble être plus faible qu'au niveau des jeunes feuilles en cours de croissance (cf. chapitre 4). Une expérience réalisée en présence de ces jeunes feuilles aurait peut-être permis d'obtenir des résultats différents.

Le comportement de ponte des femelles de teigne du poireau est également positivement affecté par la réponse induite chez le poireau lorsque celles-ci sont dans une enceinte close sans courant d'air. Ainsi, la plus forte concentration de précurseurs soufrés présents dans les feuilles de la plante pourrait orienter le choix de ces individus vers les poireaux attaqués. Ces acides aminés soufrés, et notamment le PCSO, sont détectés par les récepteurs sensoriels de la femelle et sont impliqués dans le déclenchement du comportement de ponte (Thibout et Auger, 1996). De même, chez les insectes spécialistes des crucifères, tel *P. rapae*, les concentrations

en glucosinolates détectés ont un rôle important dans l'induction du comportement de ponte (Städler et al., 1995 ; Renwick et Lopez, 1999), néanmoins les femelles de cet insecte évitent de pondre sur des plantes préalablement attaquées par des congénères (Sato et al., 1999).

Lors des expériences réalisées en tunnel de vol où les composés volatils jouent un rôle dans l'attraction des individus et donc probablement dans le comportement de ponte (Lecomte et Thibout, 1981 ; Thibout et al., 1982), le choix des femelles est orienté vers les poireaux attaqués par un faible nombre de congénères. Lorsque l'attaque est plus importante, la préférence pour le poireau attaqué disparaît, malgré la présence d'une concentration en substances soufrées non volatiles, qui comme vu précédemment, stimulerait le comportement de ponte. Cette perte de préférence pour les poireaux fortement attaqués pourrait donc être le fait d'une différence dans l'émission des substances volatiles. En effet un poireau faiblement attaqué et un poireau plus fortement attaqué n'émettent certainement pas le même ratio de concentration thiosulfates/disulfures. Ainsi un poireau fortement attaqué émet très probablement une plus forte quantité de disulfures par l'intermédiaire notamment des fèces larvaires, qu'un poireau plus faiblement attaqué, indiquant alors à la femelle, une forte présence de congénères. Des études précédentes ont montré que les thiosulfates sont beaucoup plus attractifs vis-à-vis des adultes de teigne du poireau que ne le sont les disulfures (Thibout et al., 1982). Le pouvoir attractif des disulfures pourrait alors disparaître lorsque leur concentration augmente. De même, les isothiocyanates émis par les crucifères sont attractifs pour *P. xylostella*, mais lorsque leur concentration augmente, ils deviennent répulsifs (Pivnick, et al., 1994).

Il se pourrait donc que la réponse induite chez le poireau lorsqu'elle n'est pas trop intense ait une action positive sur le comportement des individus d'*A. assectella*. En revanche, une forte réponse de la plante et l'émission par celle-ci, par le biais des fèces larvaires, d'une concentration importante de disulfures pourrait alors indiquer aux femelles la présence de congénères compétiteurs ce qui inhiberait la préférence de ces individus pour une plante préalablement attaquée. Pour pouvoir percevoir convenablement leur plante hôte, il doit donc falloir aux teignes du poireau une concentration suffisante de composés soufrés informatifs, d'où les réponses comportementales positives face à la réponse induite du poireau. Cependant, une forte concentration de composés soufrés résultant de la réponse induite chez la plante peut devenir néfaste pour le phytophage.

Contrairement à l'effet globalement positif de la réponse induite chez le poireau sur le comportement de la teigne du poireau dans les conditions expérimentales utilisées, le développement des individus est perturbé par cette réponse de la plante. Ainsi les individus mâles se développant sur des poireaux préalablement attaqués ont une durée de développement plus élevée, ce qui n'est pas le cas chez les femelles. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que les mâles étant plus légers que les femelles, pour une même quantité de nourriture ingérée, la concentration de composés potentiellement nocifs serait plus importante dans un organisme de moindre masse, et donc aurait un impact plus important sur son métabolisme. Cet allongement de la durée de développement chez les mâles et pas chez les femelles pourrait avoir des conséquences non négligeables sur la formation des couples en désynchronisant quelque peu les émergences des individus des deux sexes. La réponse induite chez la plante a également un effet important sur les femelles qui présentent une forte diminution de leur fécondité potentielle. Une réponse induite chez une plante affectant la fécondité du phytophage a déjà été observée chez le puceron *Sipha flava* se nourrissant sur *Sorghum halepense* (Costa-Arbulù et al., 2001) ou chez le doryphore, *Leptinotarsa decemlineata* en présence d'inhibiteurs de protéase pouvant être induits chez la pomme de terre (Bolter et Latoszek-Green, 1997). Toutefois, la réponse induite chez le poireau n'a pas d'influence notable dans les conditions expérimentales utilisées sur le poids des chrysalides des deux sexes et cette réponse ne provoque pas non plus une mortalité larvaire plus importante. Ces deux derniers paramètres, composantes importantes de la fitness d'un individu sont, chez d'autres espèces d'insectes phytophages, régulièrement affectés par la réponse induite chez leur plante hôte (Karban et Baldwin, 1997). Ainsi, les larves des insectes généralistes *Spodoptera exigua* et *Spodoptera littoralis* présentent une mortalité larvaire accrue et les survivants ont un poids moins élevé lorsqu'ils atteignent le stade nymphal (Alborn et al., 1996 ; McAuslane et Alborn, 2000). Néanmoins chez certains insectes spécialistes, la réponse induite de la plante n'affecte pas le phytophage (Agrawal et Karban, 1999 ; Agrawal, 2000a). Dans notre modèle d'étude, la réponse de la plante après attaque ne semble pas avoir d'effets immédiats très importants sur les capacités de développement de la teigne du poireau, cependant en diminuant la fécondité des femelles, cette réponse pourrait avoir des conséquences quantitatives importantes sur les générations suivantes.

Au regard des résultats obtenus sur le comportement et les capacités de développement de la teigne du poireau en présence de plantes préalablement attaquées, la réponse induite chez le poireau, bien qu'ayant des conséquences non négligeables sur la fitness du lépidoptère spécialiste pourrait orienter le choix de cet insecte vers une plante préalablement attaquée. Dans ce cas le choix de la plante hôte par la femelle ne garantirait pas la meilleure fitness possible pour la descendance. Cette opposition entre le comportement et la capacité de développement sur une plante a également été retrouvée dans d'autres complexes plante-phytophage. Ainsi, certains composés secondaires peuvent affecter positivement le comportement d'un insecte malgré des effets négatifs importants sur les capacités de développement de celui-ci (Adler et al., 1995 ; Mattiacci et al., 2001b ; Agrawal et Kurashige, 2003). Cependant dans notre système plante-phytophage, la préférence de la teigne du poireau pour une plante préalablement attaquée semble disparaître lorsque les signaux issus de la plante attaquée sont importants. Ces signaux pourraient donner des indications au phytophage sur la présence d'un grand nombre de congénères, et de ce fait sur l'état physiologique de la plante chez laquelle le système de défense induite a pu être mis en place. Les effets négatifs devenant alors plus nombreux que les effets positifs. Les observations de terrain semblent de plus indiquer que la teigne du poireau évite de pondre sur des plantes fortement attaquées (observations personnelles).

Il semble donc que la réponse induite chez la plante, en modifiant le comportement et en perturbant le développement de son phytophage spécialiste puisse être considérée comme un système de défense induite directe. Cependant pour s'assurer qu'une réponse induite chez une plante est un système de défense de celle-ci, il faudrait pouvoir démontrer que cette réponse engendre un gain de fitness pour la plante (Agrawal, 2000a).

Concernant les parasitoïdes en situation de choix entre un poireau sain et un poireau attaqué, les femelles de *D. pulchellus* sont particulièrement attirées par le poireau attaqué. Les odeurs issues de la plante attaquée sont donc très certainement responsables de cette attraction. Dans nos conditions expérimentales, deux types de substances composent majoritairement le bouquet de volatils issu de la plante attaquée, les thiosulfinates émis directement par la plante lors de la phase de nutrition des larves de teigne du poireau, et les disulfures émis par les fèces de ces

mêmes larves. Des études précédentes ont montré que ces deux types de substances, testées seules en olfactométrie, sont attractives vis-à-vis des femelles de *D. pulchellus*, les disulfures étant cependant plus attractifs que les thiosulfates (Lecomte et Thibout, 1984 ; 1986), contrairement aux résultats obtenus chez la teigne du poireau (Thibout et al., 1982).

Un poireau sain sur lequel sont ajoutées des fèces fraîches est également attractif, ce qui semble indiquer que l'émission de disulfures chez un poireau par le biais des fèces larvaires suffit pour provoquer l'attraction des femelles de l'ennemi naturel de la teigne du poireau.

En revanche, il n'y a pas de différence significative d'attraction entre un poireau sain coupé et un poireau attaqué puis coupé mais dont les fèces larvaires ont été enlevées. Cependant dans cette expérience, les deux poireaux émettent des thiosulfates alors que lors des expériences précédentes, les poireaux sains n'émettaient aucune odeur. En absence de disulfures, la réponse des femelles aux poireaux proposés reste néanmoins élevée, 49% d'individus attirés par l'un des deux poireaux, pour 57% et 65% lors des expériences précédentes. Il semble donc que les thiosulfates émis par un poireau blessé aient également un rôle important dans l'attraction des femelles de *D. pulchellus*.

L'émission simultanée de thiosulfates par la plante et de disulfures par les fèces larvaires provoque donc une forte attraction des femelles de *D. pulchellus*, les disulfures émis par les fèces larvaires ayant semble-t-il une influence prépondérante sur le comportement de recherche de l'hôte chez ces hyménoptères.

Les substances volatiles émises par les plantes lors de l'attaque d'un phytophage sont dans de nombreux cas utilisées par les entomophages pour la découverte de leur hôte (Dicke et Sabelis, 1988 ; Turlings et al., 1990 ; Vet et Dicke, 1992 ; Guerrieri et al., 1999 ; Neveu et al., 2002). Ces substances volatiles représentent alors des indices fiables pour la détection de l'hôte chez les entomophages attaquant ou parasitant les stades larvaires des phytophages (Dicke, 1999a). Toutefois, chez les parasitoïdes de stade nymphal tel *D. pulchellus*, la détection des composés volatils émis par la plante lors de l'attaque d'un phytophage n'implique pas à coup sûr la présence d'un hôte potentiellement parasitable, mais peut cependant, permettre la localisation de la plante abritant l'espèce hôte. Ainsi l'attraction des femelles de *D. pulchellus*, par les thiosulfates, permet la découverte de l'habitat de l'espèce hôte, mais ne permet pas nécessairement la découverte de la chrysalide hôte. En revanche, la détection de disulfures, une fois

l'habitat de l'hôte localisé, peut représenter, vis-à-vis des femelles de *D. pulchellus*, un indice chimique plus fiable de la présence d'une chrysalide hôte. En effet, lors du dernier stade larvaire, c'est à dire peu avant la nymphose, les larves de teignes sortent de leur galerie, leurs fèces sont ainsi à l'air libre et l'émission de disulfures devient alors importante. Cette émission de disulfures par les fèces larvaires provenant d'une activité bactérienne (Thibout et al., 1993 ; 1995) se produit très certainement même après la nymphose de la larve. Ainsi la détection de thiosulfates et de disulfures par les femelles de parasitoïde permet d'augmenter fortement les probabilités de rencontre avec une chrysalide de l'espèce hôte, d'autant plus que la larve va ensuite se nymphoser sur le poireau lui-même (Nowbahari et Thibout, 1992). Dans d'autres systèmes tritrophiques étudiés, les fèces larvaires permettent également la localisation de l'hôte par le parasitoïde (Agelopoulos et al., 1995 ; Cortesero et al., 1997 ; Steidle et al., 2001). En revanche, peu d'études ont été réalisées sur l'influence des substances volatiles sur le comportement de recherche de l'hôte chez les parasitoïdes de stade nymphal. Cependant, chez l'hyménoptère, *Dentichasmias busseolae*, parasitoïde du stade nymphal de *Chilo partellus*, les odeurs émises par le maïs infesté associées aux odeurs des fèces larvaires, interviennent également dans la découverte de la chrysalide hôte (Gohole et al., 2003).

Ainsi, du fait du rôle apparemment très important des disulfures, la réponse induite chez le poireau se traduisant par la modification du bouquet de composés volatils émis directement par la plante, ne semble donc pas à elle toute seule permettre une attraction optimale de l'ennemi naturel du phytophage spécialiste. Toutefois, les disulfures émis par les fèces larvaires sont issus d'une transformation bactérienne des précurseurs soufrés ingérés par les larves de teigne lors de la consommation du poireau (Auger et al., 1990 ; Thibout et al., 1993). Lorsque ces larves sont nourries sur milieu artificiel supplémenté en poudre de poireau pauvre en précurseurs soufrés, l'émission de disulfures par les fèces est moindre et l'attraction des femelles de *D. pulchellus* est réduite (Thibout et al., 1993). Aussi, il se pourrait que l'augmentation des précurseurs soufrés chez le poireau suite à l'attaque des larves de teigne puisse conduire d'une part à une plus forte émission de thiosulfates par la plante et d'autre part à une plus forte émission de disulfures par les fèces et donc à une plus forte attraction des hyménoptères. L'analyse du comportement de *D. pulchellus* en présence de deux poireaux attaqués dont l'un déjà attaqué au préalable, aurait permis d'étudier l'implication réelle de la réponse

induite, observée lors du chapitre précédent, dans l'attraction du parasitoïde. Cependant, suite à des problèmes survenus dans l'élevage de parasitoïdes, il fut impossible de réaliser ces expériences complémentaires.

Etant donné le rôle prépondérant des composés soufrés émis par le poireau dans le comportement de recherche de l'hôte par *D. pulchellus*, il semble donc que ces composés secondaires puissent représenter un système de défense indirecte de la plante. Malgré tout, pour statuer sur la mise en place d'un réel système de défense indirecte, des expériences, analysant l'impact du parasitoïde sur l'abondance de la population de teigne et les gains de fitness pour la plante qui en découlent, seraient nécessaires.

Pour lutter contre le phytophage spécialiste des *Allium*, le poireau a semble-t-il mis en place un système de défense induite directe et indirecte faisant intervenir les composés secondaires soufrés. Pourtant ces deux systèmes de défense pourraient être négativement corrélés puisque les composés impliqués font partie de la même voie de biosynthèse. Ainsi une larve de teigne se nourrissant sur un poireau chez lequel la réponse a préalablement été induite, pourrait alors séquestrer une concentration de composés soufrés plus importante pouvant alors s'avérer néfaste pour la larve du parasitoïde. En effet, il a précédemment été démontré que le taux d'émergence de parasitoïde était plus faible lorsque celui-ci est issu d'une chrysalide de teigne s'étant développé sur un milieu enrichi en substances soufrées (Bressan-Nascimento et Thibout, 2000). La réponse induite directe de la plante pourrait donc avoir des répercussions négatives sur le parasitoïde.

D'autres expériences semblent donc indispensables pour parfaire la compréhension des systèmes de défense du poireau impliquant les composés secondaires soufrés.

DISCUSSION GENERALE

Tout au long de cette étude, l'action des composés secondaires des *Allium* sur le comportement et la physiologie d'insectes satellites ou non du poireau a été analysé. La forte toxicité de ces composés soufrés sur toutes les espèces testées

semble indiquer que ces substances pourraient être impliquées dans les systèmes de défense de la plante.

Les composés secondaires soufrés constitutifs des Allium : un système de défense efficace contre les insectes généralistes...

Dans la première partie de ce manuscrit, il a été mis en évidence la très forte toxicité des substances secondaires soufrées volatiles produites par le poireau, à savoir, les thiosulfinates et leurs composés de dégradation, les disulfures. En accord avec la théorie coévolutive (Rausher, 2001), préalablement énoncée en introduction générale, il semble que la production de ces substances soufrées se soit développée dans les populations d'*Allium* sauvages et que celle-ci ait été conservée par la sélection naturelle du fait de la protection qu'elles confèrent aux plantes qui les émettent vis-à-vis d'un grand nombre d'herbivores ou de pathogènes.

Ainsi, les insectes phytophages, lors de la consommation de ces plantes, ont été confrontés aux précurseurs et aux thiosulfinates directement émis par la plante lors de la lésion des tissus, puis de nouveau aux thiosulfinates et aux disulfures émis dans leur tube digestif lors de la digestion des fragments végétaux. Ces composés soufrés, tel le DMDS qui agit sur le métabolisme respiratoire via l'inhibition de la cytochrome oxydase conduisant à une diminution brutale de la production d'ATP, ont des répercussions importantes sur le fonctionnement du système nerveux central des insectes (Dugravot et al., 2003), et peuvent provoquer la mort ou la fuite des organismes consommateurs. De ce fait, les plantes produisant de telles substances, auront été nettement moins attaquées par les insectes phytophages, et ont très certainement pu transmettre les gènes codant pour l'élaboration de ces composés aux générations futures.

Chez les insectes phytophages, pour survivre, des processus de reconnaissance et d'évitement de ces composés secondaires se sont donc probablement développés, et ces substances ont ainsi pu jouer par la suite un rôle de barrière chimique répulsive vis-à-vis de ces insectes (Auger et al., 1989), comme c'est le cas pour les composés soufrés produits par les crucifères (Chew, 1988). Le très faible nombre d'espèces d'herbivores capables de consommer des plantes du genre *Allium* (Arnault et al., 1986) tiendrait donc son explication dans ces phénomènes de toxicité/répulsion.

...mais pas contre les insectes spécialistes !!

Certaines espèces d'insectes sont cependant parvenues à se spécialiser pour ne plus consommer qu'une certaine famille, qu'un certain genre ou parfois même qu'une certaine espèce de végétaux caractérisés par la présence d'un type particulier de composés secondaires (Janzen, 1980). Ainsi la teigne du poireau, *Acrolepiopsis assectella*, est strictement inféodée au genre *Allium* et notamment au poireau. Il a été mis en évidence lors de la première partie de ce manuscrit, que les larves de ce lépidoptère sont nettement moins sensibles que les autres espèces testées à la toxicité des substances soufrées volatiles émises par le poireau. En mettant en place des processus adaptatifs spécifiques demeurant pour l'instant inconnus mais différents et plus efficaces que ceux pouvant être développés chez des insectes non adaptés (cf. chapitre 3), cette espèce a été amenée à se spécialiser sur les *Allium*. La mise en place de ces processus adaptatifs a permis à cet insecte de tolérer des concentrations de substances soufrées produites par sa plante hôte et de pouvoir ainsi consommer les feuilles de ce végétal sans subir de préjudice particulier majeur.

Les systèmes de défenses chimiques développés par les *Allium*, particulièrement efficaces vis-à-vis d'insectes non adaptés, ont semble-il été détournés par ce lépidoptère spécialiste. En effet, la spécialisation des teignes du poireau sur leur plante hôte a non seulement conduit les larves de cet insecte à tolérer la toxicité des substances soufrées mais a également amené ce lépidoptère à les utiliser à son profit. Ainsi, comme cela a déjà été évoqué en introduction générale, les odeurs des *Allium* stimulent l'ovogenèse et la ponte des femelles (Cadeilhan, 1965 a et b ; Rahn, 1971 ; Thibout, 1974), augmentent l'attractivité des mâles vis-à-vis de celles-ci dans la nature (Rahn, 1968), de même que l'activité locomotrice des deux sexes pendant la scotophase (Lecomte et Thibout, 1982). Par ailleurs, les substances non volatiles, les alk(en)ylcystéine sulfoxides, sont phagostimulantes pour les larves (Al-Rouz et Thibout, 1989) et déclenchent le comportement de ponte chez les femelles (Thibout et Auger, 1996). De même, les substances volatiles émises par la plante, et tout particulièrement les thiosulfates, s'avèrent quant à eux, très attractifs vis-à-vis des adultes des deux sexes et permettent donc très certainement aux teignes du poireau de découvrir leur plante hôte dans l'écosystème (Lecomte et Thibout, 1981). Enfin, la séquestration de ces

substances soufrées permettrait la protection des larves vis-à-vis de prédateurs généralistes telles les fourmis, *Formica fusca* ou *Myrmica rubra* (Nowbahari et Thibout, 1992 ; Le Roux et al., 2002).

Si de façon réductrice, on ne considère que la relation poireau-teigne du poireau, les composés soufrés ne semblent pas profitables pour la plante émettrice lorsque sont observés les nombreux avantages dont bénéficie cet insecte spécialiste. Ces composés qui, comme suggéré chez de nombreux végétaux (Fraenkel, 1959), se sont certainement développés chez les *Allium* en raison de leur potentiel défensif, rendent donc apparemment la plante plus vulnérable à l'attaque de cet insecte. Ce phénomène de détournement des défenses chimiques par les insectes spécialistes à leur profit est rencontré chez de nombreux complexes plante-phytophage et est qualifié de paradoxe des défenses des plantes ou de paradoxe de l'herbivore spécialiste, (i.e. « the lethal plant defense paradox », Fordyce, 2001 ; « the specialist herbivore paradigm », Agrawal et Kurashige, 2003). Ainsi, les insectes spécialistes des crucifères utilisent les composés soufrés produits par leur plante hôte, pourtant fortement impliqués dans les processus de défense vis-à-vis des insectes généralistes (Chew, 1988), pour localiser le substrat trophique nécessaire à leur progéniture (Wallbank et Wheatley, 1979 ; Pivnick et al., 1990 ; Renwick et al., 1992 ; van Loon et al., 1992). De même, de nombreuses espèces d'insectes phytophages spécialistes sont capables de séquestrer des composés secondaires de leur plante hôte, composés toxiques pour des espèces non adaptées. Ils peuvent de ce fait se nourrir de leur plante hôte et bénéficier d'une certaine protection vis-à-vis d'espèces entomophages (Pasteels et al., 1988 ; Schaffner et al., 1994 ; Müller et al., 2001).

Les défenses chimiques des plantes peuvent donc apparaître désavantageuses pour celles-ci lorsque les relations plantes-insectes sont appréhendées dans un complexe à deux partenaires, plante-insecte spécialiste.

Cependant, un complexe trophique aussi étroit est peu probable et même peu réaliste. Il faut prendre en considération l'ensemble des menaces potentielles que représentent les herbivores et les pathogènes sur les plantes, de même qu'il faut tenir compte des plantes compétitrices et des entomophages. Les composés secondaires toxiques tels les thiosulfates et les disulfures, en restreignant le nombre d'espèces capables de se développer aux dépens des végétaux qui les produisent, peuvent alors acquérir une place importante dans les processus de défenses de la plante et être nécessaires à sa survie.

Comment minimiser les dégâts occasionnés par un insecte spécialiste ??

En plus des substances présentes en permanence dans la plante qui compose un système de défense chimique constitutif, les végétaux ont mis en place au cours de l'évolution d'autres stratégies leur permettant de résister ou de tolérer les attaques des insectes.

Il a été mis en évidence lors de la deuxième partie de ce manuscrit, que l'attaque des larves de teigne du poireau induit chez sa plante hôte la mise en place d'une réponse se caractérisant notamment par l'augmentation de la production des composés secondaires soufrés non volatils pouvant donner lieu à une émission de composés volatils soufrés plus importante.

Les changements phénotypiques chez les plantes telle une modification de la concentration en composés secondaires suite à l'attaque d'organismes herbivores, sont considérés comme une réponse induite de la plante. Lorsque ces changements se traduisent par un bénéfice pour la plante, cette réponse est qualifiée de défense induite. Depuis 1970, dans plus de 110 plantes appartenant à 34 familles différentes, des défenses induites en réponse à l'attaque d'herbivores ont été mises en évidence (Karban et Baldwin, 1997). Au cours de l'évolution, les plantes ont été amenées à développer d'autres systèmes de défense en plus de la production constitutive de certains caractères chimiques ou physiques diminuant les capacités de développement des herbivores. Ces systèmes de défenses induites présentent dans certains cas l'avantage d'être déclenchés spécifiquement en réponse à certains stress et en particulier à une attaque d'herbivores ou de pathogènes ; la défense pourra ainsi être adaptée à l'agresseur (Stout et Bostock, 1999). De plus, ces systèmes de défenses induites permettent aux plantes de minimiser les coûts énergétiques liés aux défenses en l'absence de phytophages, les ressources peuvent ainsi être allouées pour la croissance et la reproduction du végétal (Karban et Myers, 1989).

➤ par une action directe sur la fitness du phytophage

Dans notre complexe poireau/teigne du poireau, la réponse induite de la plante a pour conséquence principale de diminuer de façon importante la fécondité

potentielle de son herbivore et semble donc pouvoir agir sur une composante essentielle de la fitness de cet insecte. Ainsi, la réponse induite chez la plante et ses effets sur le phytophage pourraient permettre de minimiser l'accroissement de la population de teigne lors des prochaines générations. Deux à 8 générations de teigne du poireau peuvent se succéder dans une saison (Bonnet, 1976), il est donc probable qu'en absence de réponse induite chez la plante, les populations de teigne pourraient être encore plus abondantes.

Comme un parallélisme étroit existe chez le poireau attaqué entre la production induite de composés soufrés et la diminution de fécondité des femelles qui s'y développent, ces substances soufrées, lorsque leur concentration augmente, pourraient avoir des conséquences néfastes sur le phytophage spécialiste. Il semblerait que les composés soufrés constitutifs du poireau aient une influence positive sur le comportement et la physiologie de la teigne du poireau (Arnault, 1982 ; Arnault et Loevenbruck, 1986), mais l'augmentation de leur concentration, c'est à dire leur induction, deviendrait néfaste. Ainsi, le comportement de cet insecte positivement affecté par les composés soufrés ne serait pas en adéquation avec ses capacités de développement lorsque les concentrations de ces substances deviennent plus importantes.

De tels effets de composés secondaires produits par la plante hôte sur les phytophages spécialistes ont également été observés dans d'autres complexes plante-insecte. Les capacités de développement du lépidoptère *Pieris rapae* spécialiste des crucifères sont également négativement affectées par les composés secondaires soufrés que sont les isothiocyanates produits et induits après attaque de la plante hôte (Agrawal et Kurashige, 2003). De la même façon, le lépidoptère *Manduca sexta*, spécialiste des plantes du genre *Nicotiana*, a développé des adaptations lui permettant de tolérer la nicotine produite par sa plante hôte (Snyder et al., 1995). Toutefois, lorsque l'on supprime l'induction de nicotine chez la plante, les larves de cet insecte effectuent leur croissance nettement plus rapidement que dans les conditions naturelles, ce qui confirme la fonction défensive de ce composé secondaire vis-à-vis du phytophage spécialiste (Voelckel et al., 2001).

Ces différents effets exercés sur les insectes spécialistes par les composés secondaires induits chez leur plante hôte, ne confèrent pas une protection totale au végétal, mais permet de minimiser les dégâts engendrés par de tels phytophages.

➤ *en attirant l'ennemi naturel du phytophage*

Les composés secondaires soufrés ont également un rôle comportemental très important pour la localisation de l'espèce hôte par le principal ennemi naturel de la teigne du poireau, l'hyménoptère parasitoïde *Diadromus pulchellus*. En effet, les femelles de cet insecte sont particulièrement attirées par les composés volatils émis par la plante en réponse à l'attaque de larves de teigne du poireau, principalement des thiosulfates, en association avec les substances volatiles soufrées émises par les fèces de cet insecte, les disulfures. On peut donc s'attendre à un rôle important des défenses indirectes chez les *Allium* grâce à l'augmentation des composés soufrés volatils suite à une attaque de teigne du poireau. Cependant, cet hyménoptère, étant un parasitoïde de stade nymphal, il ne peut pas provoquer une diminution immédiate des dégâts engendrés par la teigne du poireau. La présence de cet insecte pourrait permettre malgré tout de limiter l'accroissement des populations de teignes du poireau lors des générations futures, particulièrement chez une plante bisannuelle comme le poireau. Ainsi dans un autre complexe phytophage-parasitoïde, *Diadromus collaris*, hyménoptère très proche de *D. pulchellus*, parasitoïde des chrysalides de *Plutella xylostella* et occasionnellement d'*A. assectella*, est capable de réguler de façon importante l'abondance des populations de *P. xylostella* (Verkerk et Wright, 1996). Lors d'observations de terrain réalisées en juillet 2003, 40 % des chrysalides de teignes du poireau récoltées étaient parasitées par *D. pulchellus* et 5 % par d'autres espèces d'hyménoptères non spécialistes de cet insecte (observations personnelles).

Il semble donc que *D. pulchellus* intervienne dans la régulation des populations de teigne.

Parallèlement à ce qui vient d'être décrit, dans de nombreux complexes tritrophiques, plante-phytophage-entomophage, les signaux volatils émis par les plantes, en réponse à l'attaque d'un phytophage, permettent la localisation de celui-ci par son ennemi naturel (Dicke et Sabelis, 1988 ; Turlings et al., 1990 ; Neveu et al., 2002). Ces signaux volatils peuvent représenter ainsi un système de défense indirecte pour la plante (Dicke, 1995 ; Turlings et al., 1995 ; Paré et Tumlinson, 1999). Ce système de défense peut s'avérer efficace même dans le cas où les entomophages ne provoquent pas immédiatement une diminution des dégâts engendrés par les phytophages, leur impact sur les populations de ces insectes peut s'exercer dès la génération suivante et permettre ainsi aux plantes de minimiser les pertes de fitness (Sabelis et Bruin, 2002).

Ainsi, en ayant une action sur l'attraction de l'ennemi naturel de la teigne du poireau, les composés soufrés vont pouvoir permettre indirectement au poireau de limiter les dégâts engendrés par les générations suivantes de phytophages.

➤ *par une stratégie de tolérance des attaques modérées*

La réponse induite chez le poireau ne semble pas, d'après les résultats obtenus, être mise en place lorsque l'attaque est de trop courte durée ou lorsque l'intensité des dégâts engendrés est trop faible. La « quantité de dégâts » nécessaire pour induire une réponse chez le poireau fluctuent en outre en fonction de son âge. Ainsi, il semble que la plante n'investisse dans l'élaboration d'un système de défense probablement coûteux, qu'en cas de forte infestation et donc lorsque des dégâts importants en terme de fitness sont prévisibles à plus ou moins long terme. De même, chez la fève, *Vicia faba* ou chez le chou de Bruxelles, *Brassicae oleracea*, la réponse induite se met en place après au moins 3 jours d'attaque par un nombre élevé de phytophages (Guerrieri et al., 1999 ; Mattiacci et al., 2001). Il est probable que chez ces plantes, de faibles attaques soient tolérées et n'aient pas de conséquences importantes sur leur fitness.

Des travaux réalisés précédemment au laboratoire viennent confirmer cette hypothèse en montrant que de faibles attaques de teigne du poireau induisaient une augmentation de la fitness de la plante par un accroissement de la production de graines par celle-ci (Boscher, 1979). En revanche de très sévères attaques aboutissent à une forte diminution de la production de graines, et dans les cas extrêmes peuvent conduire à la mort de la plante (Boscher, 1979). Les conséquences de l'attaque d'insectes phytophages sur la fitness d'un végétal varient énormément en fonction du complexe plante-phytophage considéré. Une perte de 10% de la surface végétale réduit de façon significative la fitness d'une plante de la famille des piperacées, *Piper arieianum* (Marquis, 1984) alors que chez le radis sauvage, *R. raphanistrum*, une perte de 25 % de la surface végétale ne réduit pas la fitness de cette plante (Lehtilä et Strauss, 1999). Les plantes n'accusant pas de perte de fitness suite à l'attaque d'herbivores sont qualifiées de tolérantes (Strauss et Agrawal, 1999). Ces stratégies de tolérance développées par certaines plantes diminuent considérablement les coûts liés à l'herbivorie et ont ainsi pu être retenues par la sélection naturelle lorsque par exemple des insectes spécialistes sont peu affectés par

les caractères de résistance de leur plante hôte (Agrawal, 2000b). Ces phénomènes de tolérance peuvent alors aboutir à des interactions relativement stables entre les plantes et les insectes (Strauss et Agrawal, 1999).

En conclusion

Ainsi, il semble évident à travers cette étude que les composés secondaires soufrés produits par les *Allium* ont une activité biologique très importante.

Leur rôle est particulièrement déterminant dans les systèmes de défense chimiques des plantes qui les produisent et dans le maintien des relations étroites qui lient ces plantes avec le deuxième et le troisième niveau trophique. L'importance écologique des composés secondaires soufrés des *Allium* dans les relations plante-insecte présente de fortes similitudes avec les composés soufrés produits par les crucifères (Auger et Thibout, 2002). En effet, ces substances particulièrement étudiées par les scientifiques depuis les travaux de Kjaer (1963) possèdent des activités biologiques en de nombreux points comparables à celles des substances secondaires soufrées des *Allium*. Les pressions évolutives notamment exercées par les herbivores et les pathogènes ont abouti au cours de l'évolution à la mise en place de systèmes de défense quasiment comparables chez des végétaux pourtant éloignés sur le plan phylogénétique.

Cette étude aura donc permis d'un point de vue fondamental de mieux connaître l'importance écologique de ces substances soufrées dans les relations plante-insecte. Malgré tout, de nombreux points restent encore à éclaircir, notamment par des expériences de terrain pour valider celles menées en laboratoire et pour caractériser également les coûts et bénéfices en terme de fitness, liés à la production et l'induction de ces substances soufrées chez la plante lors de l'attaque d'insectes phytophages.

D'un point de vue applications potentielles, cette étude aura permis de confirmer que les substances soufrées produites par les *Allium* peuvent être de bons candidats au remplacement du bromure de méthyle pour la protection des denrées stockées et la désinfection des sols comme cela avait déjà été suggéré (Auger et al., 1994 ; 1999 ; 2002). Le nouveau protocole expérimental mis en place au début de cette thèse pour l'étude de la toxicité de ces molécules, aura été utilisé par de nombreux stagiaires,

notamment dans le cadre de contrats avec des entreprises privées. Sur l'ensemble des substances soufrées utilisées au laboratoire lors de tests de toxicité, le DMDS particulièrement étudié dans le cadre de cette thèse s'avère être la molécule qui a le plus d'avenir commercial en raison de son abondance dans les écosystèmes (Auger, communication personnelle) et de son faible coût de production. Cette étude aura permis de caractériser précisément pour la première fois le mode d'action de cette substance sur le métabolisme et le système nerveux des insectes. Suite aux résultats obtenus, notamment lors de cette étude, des brevets ont été déposés et des tests « grandeur nature » sont maintenant réalisés par une firme privée dans l'objectif d'une éventuelle mise sur le marché de cette substance soufrée, par ailleurs fortement impliquée dans les relations *Allium*-insecte.

En résumé, voici présenté en quelques mots le scénario hypothétique de défense du poireau vis-à-vis des herbivores basé sur les résultats obtenus au cours de cette étude :

Les poireaux produisent des composés soufrés qui ont une action répulsive, anti-appétante voire toxique vis-à-vis des insectes généralistes. Ce système de défense chimique semble être particulièrement efficace, car peu d'insectes généralistes se développent dans la nature aux dépens des plants de poireau. Lorsque certaines chenilles de lépidoptère telles *Cacaecimorpha pronubana* ou *Agrotis ipsilon* sont néanmoins rencontrées sur un poireau, celles-ci se nourrissent exclusivement de la partie apicale des feuilles externes de la plante et ne semblent pas capables d'occasionner des dégâts susceptibles de diminuer la fitness de celle-ci. Ainsi le poireau n'aurait pas développé de défense induite faisant intervenir les substances soufrées lors d'attaque de phytophages généralistes, les concentrations constitutives de ces composés seraient suffisantes pour la protection de la plante vis-à-vis de tels phytophages.

En revanche, les teignes du poireau ne sont pas ou peu affectées par les concentrations en substances soufrées présentes dans les plantes non attaquées, celles-ci ayant même des effets positifs sur le comportement ou le métabolisme de cet insecte (Arnault, 1982 ; Lecomte et Thibout, 1981). Les poireaux présentent des mécanismes de tolérance face à de faibles attaques engendrées par la teigne du poireau (Boscher, 1979). Par contre, lorsque les attaques augmentent et qu'ainsi des dégâts importants en terme de fitness sont prévisibles à plus ou moins long terme, le poireau met en place un système de défense induite via l'augmentation de la

production de composés soufrés. Ce système de défense pouvant s'exprimer directement sur la physiologie de l'insecte spécialiste et indirectement par le biais de l'attraction de l'ennemi naturel pourrait permettre une certaine régulation de l'abondance des populations de teignes, réduisant ainsi les risques d'une trop forte infestation qui aurait des conséquences importantes sur la fitness de la plante. La mise en place de ces stratégies de défense chez le poireau ou plus probablement chez son ancêtre sauvage et les adaptations développées par les insectes et notamment la teigne du poireau pourraient alors relever de processus « co-évolutifs ».

BIBLIOGRAPHIE

Adler, L.S., Schmitt, J. & Bowers, M.D. (1995). Genetic variation in defensive chemistry in *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae) and its effect on the specialist herbivore *Junonia coenia* (Nymphalidae). *Oecologia* **101**: 75-85.

Agelopoulos, N.G., Dicke, M. & Posthumus, M.A. (1995). Role of volatile infochemicals emitted by feces of larvae in host-searching behavior of parasitoid

Cotesia rubecula (Hymenoptera: Braconidae): a behavioral and chemical study. *J. Chem. Ecol.* **21**: 1789-1811.

Agrawal, A.A. (1998). Induced response to herbivory increased plant performance. *Science* **279**: 1201-1202.

Agrawal, A.A. (1999). Induced response to herbivory in wild radish: effects on several herbivores and plant fitness. *Ecology* **80**: 1713-1723.

Agrawal, A.A. (2000a). Specificity of induced resistance in wild radish: Causes and consequences for two specialist and two generalist caterpillars. *Oikos* **89**: 493-500.

Agrawal, A.A. (2000b). Overcompensation of plants in response to herbivory and the by-product benefits of mutualism. *Trends Plant Sci.* **5**: 309-313.

Agrawal, A.A. & Karban, R. (1999). Why induced defenses may be favored over constitutive strategies in plants. In: *Ecology and evolution of inducible defenses*, eds, R. Tollrian & D. Harvell, Princetown University Press, New Jersey, pp. 45-61.

Agrawal, A.A. & Kurashige, N.S. (2003). A role for isothiocyanates in plant resistance against the specialist herbivore *Pieris rapae*. *J. Chem. Ecol.* **29**: 1403-1415.

Agrell, J., Oleszek, W., Stochmal, A., Olsen, M. & Anderson, P. (2003). Herbivore-induced responses in alfalfa (*Medicago sativa*). *J. Chem. Ecol.* **29**: 303-320.

Alborn, H.T., Röse, U.S.R. & McAuslane, H.J. (1996). Systemic induction of feeding deterrents in cotton plants by feeding of *Spodoptera* ssp. larvae. *J. Chem. Ecol.* **22**: 919-932.

Alborn, H.T., Turlings, T.C.J., Jones, T.H., Stenhagen, G., Loughrin, J.H. & Tumlinson, J.H. (1997). An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretions. *Science* **276**: 945-949.

Al-Rouz, H. & Thibout, E. (1989). Les substances végétales non volatiles et leur effet phagostimulant sur les larves de cinquième stade de la teigne du poireau, *Acrolepiopsis assectella* (Lep.). *Reprod. Nutr. Develop.* **29**: 161-170.

Alzouma, I. (1981). Observations on the ecology of *Bruchidus atrolineatus* Pic. and *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera, Bruchidae) in Niger. In: *The ecology of bruchids attacking legumes*, ed, V. Labeyrie, Junk Publishers, The Hague, pp. 205-213.

Anderson, P. & Alborn, H. (1999). Effects on oviposition behaviour and larval development of *Spodoptera littoralis* by herbivore-induced changes in cotton plants. *Entomol. Exp. Appl.* **92**: 45-51.

Anderson, P., Jönsson, M. & Mörte, U. (2001). Variation in damage to cotton affecting larval feeding preference of *Spodoptera littoralis*. *Entomol. Exp. Appl.* **101**: 191-198.

- Arnault, C.** (1982). Conséquences de l'alimentation artificielle sur le développement larvaire de la teigne du poireau, *Acrolepiopsis assectella*. *Entomol. Exp. Appl.* **32**: 116-122.
- Arnault, C. & Loevenbruck, C.** (1986). Influence de facteurs du milieu sur la ponte et la longévité d'*Acrolepiopsis assectella* (Lepidoptera, Acrolepiidae). Rôle de la plante hôte. Variabilité des réponses. *Acta Oecologica* **7**: 27-38.
- Arnault, C., Harmata, J., Mauchamp, B. & Slama, K.** (1986). Influence of allelochemical substances of the host plant (*Allium porrum*) on development and moulting of *Acrolepiopsis assectella* (Lepidoptera). Their role as selective factors. In: *Proceedings of the 6th International Symposium on Insect-Plant Relationships*, eds, V. Labeyrie, G. Fabres & D. Lachaise, W. Junk Publishers, Dordrecht, the Netherlands, pp. 249-255.
- Arnault, I., Mondy, N., Cadoux, F. & Auger, J.** (2000). Possible interest of various sample transfer techniques for fast gas chromatography-mass spectrometric analysis of true onion volatiles. *J. Chromato. A* **896**: 117-124.
- Arnault, I., Christidès, J.P., Mandon, N., Haffner, T., Kahane, R. & Auger, J.** (2003). High-performance ion-pair chromatography method for simultaneous analysis of alliin, deoxyalliin, allicin and dipeptide precursors in garlic products using multiple mass spectrometry and UV detection. *J. Chromato. A* **991**: 69-75.
- Ashcroft, F.M. & Gribble, F.** (1998). Correlating structure and function in ATP-sensitive K⁺ channels. *TINS* **21**: 288-294.
- Ashcroft, F.M. & Gribble, F.** (2000). New windows on the mechanism of action of KATP channel openers. *TiPS* **21**: 439-445.
- Auger, J. & Thibout, E.** (2002). Substances soufrées des *Allium* et des Crucifères et leurs potentialités phytosanitaires. In : *Biopesticides d'origine végétale*, eds, C. Regnault-Roger, B.J.R. Philogène & C. Vincent, Lavoisier, Tec & Doc, Paris, pp. 7-95.
- Auger, J., Cadoux, F. & Thibout, E.** (1999). *Allium* spp. thiosulfinates as substitute fumigants for methyl bromide. *Pestic. Sci.* **55**: 200-202.
- Auger, J., Ferary, S. & Huignard, J.** (1994). A possible new class of natural sulfur pesticides for fumigation. *Ecologie* **25**: 93-101.
- Auger, J., Lecomte, C. & Thibout, E.** (1989). Leek odor analysis by gas chromatography and identification of the most active substance for the leek moth, *Acrolepiopsis assectella*. *J. Chem. Ecol.* **15**: 1847-1854.
- Auger, J., Lecomte, C. & Thibout, E.** (1990). Origin of the kairomones in the leek-moth (*Acrolepiopsis assectella*, Lep.) frass. Possible pathway from methylthio to propylthio compounds. *J. Chem. Ecol.* **16**: 1743-1750.
- Auger, J., Dugravot, S., Naudin, A., Abo-Ghaila, A., Pierre, D. & Thibout, E.** (2002). Utilisation des composés allélochimiques des *Allium* en tant qu'insecticides. *IOBC wprs Bull.* **25**: 295-306.

- Auger, J., Mellouki, F., Vannereau, A., Boscher, J., Cosson, L. & Mandon, N.** (1993). Analysis of *Allium* sulfur amino acids by HPLC after derivatization. *Chromatographia* **36**: 347-350.
- Baerlocher, F.J., Langler, R.F., Frederiksen, M.U., Georges, N.M. & Whiterell, R.D.** (1999). Structure-activity relationship for selected sulfur-rich antifungal compounds. *Austral. J. Chem.* **52**: 167-172.
- Baldwin, I.T.** (1988a). The alkaloidal responses of wild tobacco to real and simulated herbivory. *Oecologia* **77**: 378-381.
- Baldwin, I.T.** (1988b). Short-term damage-induced increases in tobacco alkaloids protect plants. *Oecologia* **75**: 367-370.
- Baldwin, I.T.** (1989). Mechanism of damage-induced alkaloid production in wild tobacco. *J. Chem. Ecol.* **15**: 1661-1680.
- Baldwin, I.T.** (1996). Methyl-jasmonate induced nicotine production in *Nicotiana attenuata*: Inducing defenses in the field without wounding. *Entomol. Exp. Appl.* **80**: 213-220.
- Baldwin, I.T.** (1998). Jasmonate-induced responses are costly but benefit plants under native populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 8113-8118.
- Baldwin, I.T.** (1999). Inducible nicotine production in native *Nicotiana* as an example of adaptive phenotypic plasticity. *J. Chem. Ecol.* **25**: 3-30.
- Baldwin, I.T. & Preston, C.A.** (1999). The eco-physiological complexity of plant responses to insect herbivores. *Planta* **208**: 137-145.
- Baldwin, I.T., Zhang, Z.P., Diab, N., Ohnmeiss, T.E., McCloud, E.S., Lynds, G.Y. & Schmelz, E.A.** (1997). Quantification, correlations and manipulation of wound-induced changes in jasmonic acid and nicotine in *Nicotiana sylvestris*. *Planta* **201**: 397-404.
- Bartlett, E., Kiddle, G., Williams, I. & Wallsgrove, R.** (1999). Wound-induced increases in the glucosinolate content of oilseed rape and their effect on subsequent herbivory by a crucifer specialist. *Entomol. Exp. Appl.* **91**: 163-167.
- Baur, R., Kostal, V., Patrian, B. & Städler, E.** (1996). Preference for plants damaged by conspecific larvae in ovipositing cabbage root flies: influence of stimuli from leaf surface and roots. *Entomol. Exp. Appl.* **81**: 353-364.
- Bell, C.H.** (2000). Fumigation in the 21st century. *Crop Protection* **19**: 563-569.
- Berenbaum, M.R.** (1978). Toxicity of a furanocoumarin to armyworms: a case of biosynthetic escape from insect herbivores. *Science* **201**: 532-534.
- Berenbaum, M.R.** (1981). Pattern of furanocoumarin production and insect herbivory in a population of wild parsnip (*Pastinaca sativa* L.). *Oecologia*, **49**: 236-244.

- Berenbaum, M.R.** (1986). Target site insensitivity in insect-plant interactions. In: *Molecular Aspects of Insect-Plant Associations*, eds, L.B. Brattsten & S. Ahmad, Plenum Press, New York, pp. 257-272.
- Berenbaum, M.R., Zangerl, A.R. & Lee, K.** (1989). Chemical barriers to adaptation by a specialist herbivore. *Oecologia* **80**: 501-506.
- Bernasconi, M.L., Turlings, T.C.J., Edwards, P.J., Fritzsche-Hoballah, M.E., Ambrosetti, L., Bassetti, P. & Dorn, S.** (2001). Response of natural populations of predators and parasitoids to artificially induced volatile emissions in maize plants. *Agric. Forest Entomol.* **3**: 201-209.
- Bernays, E.A. & Chapman, R.F.** (1994). Host plant selection by phytophagous insects. Chapman & Hall, New York, 312 pp.
- Bernays, E. & Graham, M.** (1988). On the evolution of host specificity in phytophagous insects. *Ecology* **69**: 886-892.
- Block, E.** (1992). The organosulfur chemistry of the genus *Allium* – Implications for the organic chemistry of sulfur. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **31**: 1135-1178.
- Bodnaryk, R.P.** (1992). Effects of wounding on glucosinolates in the cotyledons of oilseed rape and mustard. *Phytochemistry* **31**: 2671-2677.
- Boeke, S.J., Sinzogan, A.A.C., de Almeida, R.P., de Boer, P.W.M., Jeong, G., Kossou, D.K. & van Loon, J.J.A.** (2003). Side-effects of cowpea treatment with botanical insecticides on two parasitoids of *Callosobruchus maculatus*. *Entomol. Exp. Appl.* **108**: 43-51.
- Boivin, G.** (2001). Parasitoïdes et lutte biologique: paradigme ou panacée ? *VertigO* vol 2, n°2.
- Boivin, T., Chabert d'Hières, C., Bouvier, J.C., Beslay, D. & Sauphanor, B.** (2001). Pleiotropy of insecticide resistance in the codling moth, *Cydia pomonella*. *Entomol. Exp. Appl.* **99**: 381-386.
- Bolter, C.J. & Latoszek-Green, M.** (1997). Effect of chronic ingestion on the cysteine proteinase inhibitor, E64, on Colorado potato beetle gut proteinases. *Entomol. Exp. Appl.* **83**: 295-303.
- Bolter, C.J., Dicke, M., van Loon, J.J.A., Visser, J.H. & Posthumus, M.A.** (1997). Attraction of Colorado potato beetle to herbivore damaged plants during herbivory and after its termination. *J. Chem. Ecol.* **23**: 1003-1023.
- Bonnet, B.** (1976). Le poireau (*Allium porrum* L.): aspects botaniques et agronomiques. *Revue bibliographique. Saussurea* **7**: 121-155.
- Boscher, J.** (1979). Modified reproduction strategy of leek *Allium porrum* in response to a phytophagous insect, *Acrolepiopsis assectella*. *Oikos* **33**: 451-456.

- Boscher, J., Auger, J. Mandon, N. & Ferary, S.** (1995). Qualitative and quantitative comparison of volatile sulphides and flavour precursors in different organs of some wild and cultivated garlic. *Biochem. System. Ecol.* **23**: 787-791.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analysis Biochem.* **7**: 248-254.
- Brattsten, L.B.** (1992). Metabolic defenses against plant allelochemicals. In: *Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites*, eds, G. Rosenthal & M. Berenbaum, Academic Press, San Diego, Vol. 2. pp. 175-242.
- Bressan-Nascimento, S. & Thibout, E.** (2000). Effects of sulfur-containing precursors of *Allium* secondary metabolites on behavior and physiology of *Diadromus pulchellus*, a specialist parasitoid of *Acrolepiopsis assectella*. *J. Chem. Ecol.* **26**: 2459-2472.
- Buckingham, S.D., Lapied, B., Le Corrionc, H., Grolleau, F. & Satelle, D.B.** (1997). Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. *J. Exp. Biol.* **200**: 2685-2692.
- Cadeilhan, L.** (1965a). Stimulation de la ponte d'*Acrolepia assectella* Zell. par la présence de la plante-hôte. *C.R. Acad. Sc. Paris (D)* **261**: 1106-1109.
- Cadeilhan, L.** (1965b). Action de la plante-hôte sur l'ovogenèse de l'adulte d'*Acrolepia assectella* Zell. *C.R. Acad. Sc. Paris (D)* **261**: 1910-1913.
- Carlini, C.R. & Grossi-de-Sa, M.F.** (2002). Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* **40**: 1515-1539.
- Caswell, G.H.** (1961). The infestation of cowpea in western region of Nigeria. *Tropic. Sci.* **3**: 154-158.
- Chen, Z.-L. & Zhu, D.-Y.** (1987). *Aristolochia* alkaloids. In: *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*, ed, A. Brossi, Academic Press, San Diego, pp. 29-65.
- Chew, F.S.** (1988). Searching for defensive chemistry in the Cruciferae, do glucosinolates always control interactions of Cruciferae with their potential herbivores and symbionts? No. In: *Chemical Mediation of Coevolution*, ed, C. Spencer. Academic press, San Diego, pp. 81-112.
- Chew, F.S. & Rodman, J.E.** (1979). Plant resources for chemical defense. In: *Herbivores: Their interaction with secondary plant metabolites*, eds, G. Rosenthal & M. Berenbaum, Academic Press, New York, pp. 271-307.
- Constabel, C.P.** (1999). A survey of herbivore-inducible defensive proteins and phytochemicals. In: *Induced plant defense against pathogens and herbivores, biochemistry, ecology and agriculture*, eds, A.A. Agrawal, S. Tuzun, & E. Bent, the American Phytopathologist Society, St Paul, pp. 137-166.

- Cooper-Driver, G.A. & Swain, T.** (1976). Cyanogenic polymorphism in bracken in relation to herbivore predation. *Nature* **260**: 604.
- Cortesero, A.-M., De Moraes, C.M., Stapel, J.O. & Lewis, W.J.** (1997). Comparisons and contrasts in host foraging strategies of two larval parasitoids with different degrees of host specificity. *J. Chem. Ecol.* **23**: 1589-1606.
- Costa-Arbulù, C., Gianoli, E., Gonzales, W.L. & Niemeyer, H.M.** (2001). Feeding by the aphid *Sipha flava* produces a reddish spot on leaves of *Sorghum halepense*: An induced defense ? *J. Chem. Ecol.* **27**: 273-283.
- Crawley, M.J.** (1997). Plant-herbivore dynamics. In: *Plant ecology*, ed, M.J. Crawley. Blackwell, pp. 401-474.
- Creelman, R.A. & Mullet, J.E.** (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 355-381.
- Creelman, R.A., Tierney, M.L. & Mullet, J.E.** (1992). Jasmonic acid / methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 4938-4941.
- Dakkouni, M.** (1982). Etude du comportement de ponte, et des différentes stimulations intervenant dans l'émission des œufs d'*Acrolepiopsis (Acrolepia) assectella* Zell. (Lep. Hyponeumotoïdea), en relation avec sa plante-hôte, *Allium porrum* L. Thèse de 3^{ème} Cycle, Université de Tours, 132 pages.
- De Moraes, C.M., Lewis, W.J., Paré, P.W., Alborn, H.T. & Tumlinson, J.H.** (1998). Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. *Nature* **393**: 570-573.
- Delobel, A. & Tran, M.** (1993). Les coléoptères des denrées alimentaires dans les régions chaudes. Orstom Editions, 424 pages.
- Dicke, M.** (1994). Local and systemic production of volatiles herbivore-induced terpenoids: their role in plant-carnivore mutualism. *J. Plant. Physiol.* **143**: 465-472.
- Dicke, M.** (1995). Why do plants "talk" ? *Chemoecology* **6**: 159-165.
- Dicke, M.** (1999a). Are herbivore-induced plant volatiles reliable indicators of herbivore identity to foraging carnivorous arthropods? *Entomol. Exp. Appl.* **91**: 131-142.
- Dicke, M.** (1999b). Specificity of herbivore-induced plant defences. In: *Insect-plant interactions and induced plant defence*, eds, D.J. Chadwick & J. Goode, Wiley, Chicester (Novartis Foundation symposium 223), pp. 43-54.
- Dicke, M. & Sabelis, M.W.** (1988). Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds ? *Funct. Ecol.* **2**: 131-139.

- Dicke, M., Gols, R., Ludeking, D. & Posthumus, M.A.** (1999). Jasmonic acid and herbivory differentially induce carnivore-attracting plant volatiles in Lima bean plants. *J. Chem. Ecol.* **25**: 1907-1922.
- Dicke, M., Sabelis, M.W., Takabayashi, J., Bruin, J. & Posthumus, M.A.** (1990). Plant strategies of manipulating predator-prey interactions through allelochemicals: prospects for application in pest control. *J. Chem. Ecol.* **16**: 3091-3118.
- Dirzo, R. & Harper, J.L.** (1982). Experimental studies on slug-plant interactions. The performance of cyanogenic and acyanogenic morphs of *Trifolium repens* in the field. *J. Ecol.* **70**: 119-138.
- Douce, R., Bourguignon, J., Brouquisse, R. & Neuburger, M.** (1987). Isolation of plant mitochondria: general principles and criteria of integrity. *Methods Enzymol.* **148**: 403-415.
- Duffey, S.S.** (1980). Sequestration of plant natural products by insects. *Annu. Rev. Entomol.* **25**: 447-477.
- Duffey, S.S. & Stout, M.J.** (1996). Antinutritive and toxic components of plant defense against insects. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **32**: 3-37.
- Dugravot, S., Sanon, A. Thibout, E. & Huignard, J.** (2002). Susceptibility of *Callosobruchus maculatus* and its parasitoid *Dinarmus basalis* to two sulphur containing compounds. Consequences on biological control. *Environ. Entomol.* **31**: 550-557.
- Dugravot, S., Grolleau, F., Macherel, D., Rochetaing, A., Hue, B., Stankiewicz, M., Huignard, J. & Lapied, B.** (2003). Dimethyl disulfide exerts insecticidal neurotoxicity through mitochondrial dysfunction and activation of insect KATP channels. *J. Neurophysiol.* **90**: 259-270.
- Ehrlich, P.R. & Raven, P.H.** (1964). Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution* **18**: 586-608.
- Farmer, E.E. & Ryan, C.A.** (1992). Octadecanoic precursors of a jasmonic acid activate the synthesis of wound inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* **4**: 129-134.
- Feeny, P.** (1975). Biochemical coevolution between plants and their insect herbivores. In: *Coevolution of animals and plants*, eds, L.E. Gilbert & P.H. Raven, Univ of Texas Press, Austin, pp. 3-19.
- Feeny, P.** (1976). Plant apparency and chemical defense. *Rec. Adv. Phytochem.* **10**: 1-40.
- Feeny, P.**, (1977). Defensive ecology of the Cruciferae. *Ann. Missouri Bot. Garden* **64**: 221-234.
- Ferary, S. & Auger, J.** (1996). What is the true odor of cut *Allium* ? Complementary of various hyphenated methods: gas chromatography-mass spectrometry and

high-performance liquid chromatography-mass spectrometry with particle beam and atmospheric pressure ionization interfaces in sulphenic acids rearrangement components discrimination. *J. Chromato. A* **750**: 63-74.

Finney, D. L. 1971. Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press.

Fordyce, J.A. (2001). The lethal plant defense paradox remains: Inducible host-plant aristolochic acids and the growth and defense of the pipevine swallowtail. *Entomol. Exp. Appl.* **100**: 339-346.

Fraenkel, G. (1959). The raison d'être of secondary plant substances. *Science* **129**: 1466-1470.

Francis, F. (1999). Conséquences évolutives des relations entre le puceron et son prédateur en présence de substances allélochimiques chez les Brassicaceae. 5ème Conférence Internationale sur les Ravageurs en Agriculture, Annales ANPP, Tome II pp. 503-510.

Freeman, G.G. (1975). Distribution of flavour components in onion (*Allium cepa* L.), leek (*Allium porrum*) and garlic (*Allium sativum*). *J. Sci. Fd. Agric.* **26**: 471-481.

Frediani, D. (1954). Ricerche morfologiche sull' *Acrolepia assectella* Zell. (Lepidoptera : Plutellidae) Nell' Italia centrale. *Redia* **39**: 187-249.

Fritzsche-Hoballah, M.E. & Turlings, T.C.J. (2001). Experimental evidence that plants under caterpillar attack may benefit from attracting parasitoid. *Evol. Ecol. Res.* **3**: 553-565.

Fritzsche-Hoballah, M.E., Tamo, C. & Turlings, T.C.J. (2002). Differential attractiveness of induced odors emitted by eight maize varieties for the parasitoid *Cotesia marginiventris*: is quality or quantity important? *J. Chem. Ecol.* **28**: 951-968.

Futuyama, D.J. (1983). Evolutionary interactions between herbivorous insects and plants. In: *Coevolution*, eds, D.J. Futuyama & M. Slatkin, pp. 207-231.

Futuyama, D.J. (2000). Some current approaches to the evolution of plant-herbivore interactions. *Plant Spec. Biol.* **15**: 1-9.

Giamoustaris, A. & Mithen, R. (1995). The effects of modifying the glucosinolate content of leaves of oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *Oleifera*) on its interactions with specialist and generalist pests. *Ann. Appl. Biol.* **126**: 347-363.

Gohole, L.S., Overholt, W.A., Khan, Z.R. & Vet, L.E.M. (2003). Role of volatiles emitted by host and non-host plants in the foraging behaviour of *Dentichasmias busseolae*, a pupal parasitoid of the spotted stemborer *Chilo partellus*. *Entomol. Exp. Appl.* **107**: 1-9.

Green, T.R. & Ryan, C.A. (1972). Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: A possible defense mechanism against insects. *Science* **175**: 776-777.

- Grolleau, F. & Lapied, B.** (2000). Dorsal unpaired median neurones in the insect central nervous system: towards a better understanding of the ionic mechanisms underlying spontaneous electrical activity. *J. Exp. Biol.* **203**: 1633-1648.
- Guerrieri, E., Poppy, G.M., Powell, W., Tremblay, E. & Pennachio, F.** (1999). Induction and systemic release of herbivore-induced plant volatiles mediating in flight-orientation of *Aphidius ervi*. *J. Chem. Ecol.* **25**: 1247-1261.
- Guyonnet, D., Belloir, C., Suschetet, M., Siess, M.-H. & Le Bon, A.-M.** (2001). Antimutagenic activity of organosulfur compounds from *Allium* is associated with phase II enzyme induction. *Mutation Res.* **495**: 135-145.
- Hartmann, T.** (1996). Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. *Entomol. Exp. Appl.* **80**: 177-188.
- Hawkes, C.V. & Sullivan, J.J.** (2001). The impact of herbivory on plants in different conditions: meta-analysis. *Ecology* **82**: 2045-2058.
- Hawkins, B.A., Cornell, H.V. & Hochberg, M.E.** (1997). Predators, parasitoids, and pathogens as mortality agents in phytophagous insect populations. *Ecology* **78**: 2145-2152.
- Hilder, V.A., Gatehouse, A.M.R., Sheerman, S.E., Barker, R.F. & Boulter, D.** (1987). A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature* **300**: 160-163.
- Holzinger, F., Frick, C. & Wink, M.** (1992). Molecular basis for the insensitivity of the monarch butterfly (*Danaus plexippus*) to cardiac glycosides. *FEBS Letters* **314**: 477-480.
- Hopkins, R.J., Griffiths, D.W., Birch, A.N.E. & McKinlay, R.G.** (1998). Influence of increasing herbivore pressure on modification of glucosinolate content of swedes (*Brassica napus* ssp. *rapifera*). *J. Chem. Ecol.* **24**: 2003-2019.
- Howe, G.A., Lightner, J., Browse, J. & Ryan, C.A.** (1996). An octadecanoic pathway mutant (JL5) of tomato is compromised in signalling for defense against insect attack. *Plant Cell* **8**: 2067-2077.
- Hue, B. & Callec, J.J.** (1990). Electrophysiology and pharmacology of synaptic transmission in the central nervous system of the cockroach. In: *Cockroaches as models for neurobiology: Application in biomedical research*, eds, I. Huber, E.P. Masler & B.R. Rao, Boca Raton Florida, CRC Press, pp. 149-168.
- Hue, B. & Piek, T.** (1989). Irreversible presynaptic activation-induced block of transmission in the insect CNS by hemicholinium-3 and threonine-6-bradykinin. *Comp. Biochem. Physiol.* **93**: 87-89.
- Huignard, J., Dugravot, S., Ketoh, K.G., Thibout, E. & Glitho, A.I.** (2002). Utilisation de composés secondaires des végétaux pour la protection des graines d'une légumineuse, le niébé. Conséquences sur les insectes ravageurs et leurs parasitoïdes. In: *Biopesticides d'origine végétale*, eds, C. Regnault-Roger, B.J.R. Philogène & C. Vincent, Lavoisier, Tech & Doc, Paris, pp. 133-149.

- Inagaki, N., Gono, T., Clement, J.P., Wang, C.Z., Aguilar-Bryan, L., Bryan, J. & Seino, S.** (1996). A family of sulfoxylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels. *Neuron* **16**: 1011-1017.
- Isman, M.B.** (1992). A physiological perspective. In: *Insect Chemical Ecology*, eds, B.D. Roitberg & M.B. Isman, Chapman & Hall, New York, pp. 156-176.
- Isman, M.B.** (1997). Neem insecticides. *Pestic. Outlook* **8**: 32-38.
- Jaillais, B., Cadoux, F. & Auger, J.** (1999). SPME-HPLC analysis of *Allium* lacrymatory factor and thiosulfinates. *Talanta* **50**: 423-431.
- Janzen, D.H.** (1969). Seed-eaters versus seed size, number, dispersal and toxicity. *Evolution* **23**: 1-27.
- Janzen, D.H.** (1980). When it is coevolution ? *Evolution* **34**: 611-612.
- Jermey, T.** (1976). Insect host-plant relationship : co-evolution or sequential evolution? *Symp. Biol. Hung.* **16**: 109-113.
- Jermey, T.** (1984). Evolution of insect/host plant relationships. *Am. Nat.* **124**: 609-630.
- Johnson, R., Narvaez, J., An, G. & Ryan, C.A.** (1989). Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: Effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 9871-9875.
- Kalmès, R.** (1984). Examen des problèmes posés par la sympatrie sur *Acrolepiopsis assectella* (Lépidoptère, Yponomeutoide) dans le sud-est de la France des deux Hyménoptères Ichneumonidae *Diadromus collaris* et *Diadromus pulchellus*. Thèse de Doctorat, Université de Tours, 187 pages.
- Karban, R. & Baldwin, I.T.** (1997). Induced responses to herbivory, ed, J.N. Thompson, Univ. Chicago Press, Chicago, 319 pp.
- Karban, R. & Myers, J.H.** (1989). Induced plant response to herbivory. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **20**: 331-348.
- Kessler, A. & Baldwin, I.T.** (2001). Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* **291**: 2141-2144.
- Kendall, D.M. & Bjostad, L.B.** (1990). Phytohormone ecology: Herbivory by *Thrips tabaci* induces greater ethylene production in intact onions than mechanical damage alone. *J. Chem. Ecol.* **16**: 1445-1457.
- Kjaer, A.** (1963). The distribution of sulphur compounds. In: *Chemical plant taxonomy*, ed, T. Swain, Academic Press, London, pp. 453-475.

- Kjaer, A., Madsen, J., Maeda, Y., Ozawa, Y. & Uda, Y.** (1978). Volatiles in distillates of processed radish of Japanese origin. *Agric. Biol. Chem.* **42**: 1989-1996.
- Koritsas, V.M., Lewis, J.A. & Fenwick, G.R.** (1991). Glucosinolate responses of oilseed rape, mustard and kale to mechanical wounding and infestation by the cabbage stem flea beetle. *Ann. Appl. Biol.* **118**: 209-221.
- Krieger, R., Feeny, P.P. & Wilkinson, C.F.** (1971). Detoxification enzymes in the guts of caterpillars: an evolutionary answer to plant defense ? *Science* **172**: 579-581.
- Labeyrie, V.** (1956). Observations sur la teigne du poireau (*Acrolepia assectella* Zell.). *Rev. Zool. Agric. Appl.* 1-6.
- Labeyrie, V.** (1960). Contributions à l'étude de la dynamique des populations d'insectes. Influence stimulatrice de l'hôte *Acrolepia assectella* Z. sur la multiplication d'un hyménoptère Ichneumonidae (*Diadromus* sp.) *Entomophaga* Mem.1 pp.193.
- Labeyrie, V.** (1966). Sous-famille des Acrolepiinae. In : *Entomologie appliquée à l'agriculture*, ed, A.S. Balachowsky, Masson et Cie, pp. 233-249.
- Lancaster, J.E. & Collin, H.A.** (1981). Presence of alliinase in isolated vacuoles and of alkyl cysteine sulfoxides in the cytoplasm of bulbs of onion (*Allium cepa*). *Plant Sci. Let.* **22**: 169-176.
- Lapied, B., Grolleau, F. & Satelle, D.B.** (2001). Indoxacarb, an oxadiazine insecticide, blocks insect neuronal sodium channels. *Brit. J. Pharmacol.* **132**: 587-595.
- Lapied, B., Malécot, C.O. & Pelhate, M.** (1989). Ionic species involved in the electrical activity of single aminergic neurones isolated from the sixth abdominal ganglion of the cockroach *Periplaneta americana*. *J. Exp. Biol.* **144**: 535-549.
- Lapied, B., Malécot, C.O. & Pelhate, M.** (1990). Patch clamp study of the properties of the sodium current in cockroach single isolated adult aminergic neurones. *J. Exp. Biol.* **151**: 387-403.
- Lauwerys, R.** (1990). Toxicologie professionnelle et intoxications industrielles. Masson, Paris.
- Le Roux, A.-M., Le Roux, G. & Thibout, E.** (2002) Food experience on the predatory behavior of the ant *Myrmica rubra* towards a specialist moth, *Acrolepiopsis assectella*. *J. Chem. Ecol.* **28**: 2307-2314.
- Lecomte, C.** (1976). Premières observations sur la biologie et les dégâts de la teigne du poireau *Acrolepiopsis (Acrolepia) assectella* Zeller (Microlépidoptère Plutellidae) sur le littoral algérois. *Bull. Soc. Hist. Nat. d'Afr. du Nord* **67**: 49-56.

- Lecomte, C. & Thibout, E.** (1981). Attraction d'*Acrolepiopsis assectella*, en olfactomètre par des substances allélochimiques volatiles d'*Allium porrum*. *Entomol. Exp. Appl.* **30**: 293-300.
- Lecomte, C. & Thibout, E.** (1982). Mise en évidence de mouvements verticaux quotidiens et influence de la plante-hôte, de l'âge et de la fécondation sur le rythme d'activité d'*Acrolepia assectella* Zell. (Lépidoptère). *Acta Oecologica/Oecol. Appl.* **3**: 233-240.
- Lecomte, C. & Thibout, E.** (1984). Etude olfactométrique de l'action de diverses substances allélochimiques végétales dans la recherche de l'hôte par *Diadromus pulchellus* (Hymenoptera, Ichneumonidae). *Entomol. Exp. Appl.* **35**: 295-303.
- Lecomte, C. & Thibout, E.** (1986). Analyse, dans deux types d'olfactomètres, du comportement de quête des femelles de *Diadromus pulchellus* en présence d'odeurs du phytophage hôte et du végétal attaqué ou non. *Entomophaga* **31**: 69-78.
- Lecomte C., Thibout, E. & Auger J.** (1987). Host plant identification and selection by the specialist leek moth: An overview. *Phytophaga* **1**: 105-119.
- Lehtilä, K.P. & Strauss, S.Y.** (1999). Effects of foliar herbivory on male and female reproductive traits of wild radish, *Raphanus raphanistrum*. *Ecology* **80**: 116-124.
- Li, Q., Eigenbrode, S.D., Stringham, G.R. & Thiagarajah, M.R.** (2000). Feeding and growth of *Plutella xylostella* and *Spodoptera eridania* on *Brassica juncea* with varying glucosinolates concentrations and myrosinase activities. *J. Chem. Ecol.* **26**: 2401-2419.
- Liénard, V. & Haubruge, E.** (1994). L'activité glutathion S-transférase et son induction chez *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) par différents inducteurs. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent* **59**: 487-492.
- Louda, S. & Mole, S.** (1991). Glucosinolates: Chemistry and ecology. In: *Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites*, eds, G. Rosenthal & M. Berenbaum, Academic Press, San Diego, Vol. 1. pp. 123-164.
- Malamy, J., Carr, J.P., Klesig, D.F. & Raskin, I.** (1990). Salicylic acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* **250**: 1002-1004.
- Marquis, R.J.** (1984). Leaf herbivores decrease fitness of a tropical plant. *Science* **226**: 537-539.
- Mattiacci, L., Dicke, M. & Posthumus, M.A.** (1994). Induction of parasitoid attracting synomone in brussels sprouts plants by feeding by *Pieris brassicae* larvae: role of mechanical damage and herbivore elicitor. *J. Chem. Ecol.* **20**: 2229-2247.

- Mattiacci, L., Dicke, M. & Posthumus, M.A.** (1995). Beta-glucosidase: an elicitor of herbivore-induced plant odors that attracts host-searching parasitic wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 2036-2040.
- Mattiacci, L., Ambühl Rocca, B., Scascighini N., D'Alessandro, M. & Dorn, S.** (2001a). Systemically-induced plant volatiles emitted at the time of danger. *J. Chem. Ecol.* **27**: 2233-2252.
- Mattiacci, L., Rudelli, S., Ambühl Rocca, B., Genini, S. & Dorn, S.** (2001b). Systemically-induced response of cabbage plants against a specialist herbivore, *Pieris brassicae*. *Chemoecology* **11**: 167-173.
- Mauricio, R. & Rausher, M.D.** (1997). Experimental manipulation of putative selective agents provide evidence for the role of natural enemies in the evolution of plant defense. *Evolution* **51**: 1435-1444.
- McAuslane, H.J. & Alborn, H.T.** (2000). Systemic induction of terpenoid aldehydes in cotton pigment glands by feeding of larval *Spodoptera exigua* larvae on glanded and glandless cotton. *Entomol. Exp. Appl.* **97**: 283-291.
- McAuslane, H.J., Alborn, H.T. & Toth, J.P.** (1997). Systemic induction of terpenoids aldehydes in cotton pigment glands by feeding of larval *Spodoptera exigua*. *J. Chem. Ecol.* **23**: 2861-2879.
- McAuslane, H.J., Vinson, S.B. & Williams, H.J.** (1991). Stimuli influencing host microhabitat location in the parasitoid *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Entomol. Exp. Appl.* **58**: 267-277.
- McKey, D.** (1979). The distribution of secondary compounds within plants. In: *Herbivores: Their interaction with secondary plant metabolites*, eds, G. Rosenthal & M. Berenbaum, Academic Press, New York, pp. 55-133.
- Moller, I.M. & Rasmusson, A.G.** (1998). The role of NADP in the mitochondrial matrix. *Trends Plant Sci.* **3**: 21-27.
- Mondy, N., Duplat, D., Christides, J.-P., Mandon, N. & Auger, J.** (2002). Aroma analysis of fresh and preserved onions and leek by dual solid-phase microextraction-liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromato. A* **963**: 89-93.
- Monge, J. P., Dupont, P., Idi, A. & Huignard J.** (1995). The consequences of interspecific competition between *Dinarmus basalis* and *Eupelmus vuilletti* on the development of their host populations. *Acta Oecologica* **16**: 19-30.
- Mueller, M.J. & Brodschelm, W.** (1994). Quantification of jasmonic acid by capillary gas chromatography-negative chemical ionization-mass spectrometry. *Annal. Biochem.* **218**: 425-435.
- Müller, C., Agerbirk, N., Olsen, C.E., Boevé, J.-L., Schaffner, U. & Brakefield, P.M.** (2001). Sequestration of host plant glucosinolates in the defensive haemolymph of the sawfly *Athalia rosae*. *J. Chem. Ecol.* **27**: 2505-2516.

- Musser, R.O., Hum-Musser, S.M., Eichenseer, H., Peiffer, M., Ervin, G., Murphy, J.B. & Felton, G.W.** (2002). Catterpillar saliva beats plant defences. *Nature* **416**: 599-600.
- Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher, U., Elbert, A., Jeschke, P. & Tietjen, K.** (2001). Acetylcholine receptors as site for developing neonicotinoid insecticides. In: *Biochemical sites of insecticide action and resistance*, ed, I. Ishaaya, Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, pp. 77-105.
- Neveu, N., Grandgirard, J., Nenon, J.-P., Cortesero, A.-M.** (2002). Systemic release of herbivore-induced plant volatiles by turnips infested by concealed root-feeding larvae *Delia radicum* L. *J. Chem. Ecol.* **28**: 1717-1732.
- Nishimura, K.** (1993). Oviposition strategy of the parasitic wasp *Dinarmus basalis* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Evol. Ecol.* **7**: 199-206.
- Nowbahari, B. & Thibout, E.** (1992). Defensive role of *Allium* sulfur compounds for leek moth *Acrolepiopsis assectella* Z. (Lepidoptera) against generalist predators. *J. Chem. Ecol.* **18**: 1991-2002.
- Ohnmeiss, T.E. & Baldwin, I.T.** (2000). Optimal defense theory predicts the ontogeny of an induced nicotine defense. *Ecology* **81**: 1765-1783.
- Orozco-Cardenas, M., McGurl, B. & Ryan, C.A.** (1993). Expression of antisense prosystemin gene in tomato plants reduces resistance toward *Manduca sexta* larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 8273-8276.
- Ouédraogo, A.P.** (1991). Analyse du déterminisme du polymorphisme imaginal chez *Callosobruchus maculatus*. Thèse de doctorat, Université de Tours, 113 pages.
- Ouédraogo, A.P., Sou, S., Sanon, A., Monge, J.P., Huignard, J., Tran, M.D. & Credland, P.F.** (1996). Influence of temperature and humidity on populations of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and its parasitoid *Dinarmus basalis* (Pteromalidae) in two zones of Burkina Faso. *Bull. Entomol. Res.* **86**: 695-702.
- Paré, P.W. & Tumlinson, J.H.** (1999). Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiol.* **121**: 325-332.
- Paré, P.W., Alborn, H.T. & Tumlinson, J.H.** (1998). Concerted biosynthesis of an insect elicitor of plant volatiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 13971-13975.
- Pasteels, J.M., Rowell-Rahier, M., Randoux, T., Braekman, J.C. & Daloze, D.** (1988). Pyrrolizidine alkaloids of probable host-plant origin in the pronotal and elytral secretion of leaf beetle *Oreina cacaliae*. *Entomol. Exp. Appl.* **49**: 55-58.
- Pelhate, M., Pichon, Y. & Beadle, D.J.** (1990). Cockroach axons and cell bodies: Electrical activity. In: *Cockroaches as models for neurobiology: Application in biomedical research*, eds, I. Huber, E.P. Masler & B.R. Rao, Boca Raton Florida, CRC Press, pp. 131-148.

- Peñas –Cortès, H., Sanchez-Serrano, J.J., Mertens, R., Willmitzer, L. & Prat, S.** (1989). Abscissic acid is involved in the wound-induced expression of the proteinase inhibitor II gene in potato and tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 9851-9855.
- Philogène, B.J.R., Regnault-Roger, C. & Vincent, C.** (2002). Produits phytosanitaires insecticides d'origine végétale: promesses d'hier et d'aujourd'hui. In: *Biopesticides d'origine végétale*, eds, C. Regnault-Roger, B.J.R. Philogène & C. Vincent, Lavoisier, Tech & Doc, Paris, pp. 1-17.
- Pivnick, K.A., Jarvis, B.J. & Slater, G.P.** (1994). Identification of olfactory cues used in host-plant finding by diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Chem. Ecol.* **20**: 1407-1427.
- Pivnick, K.A., Jarvis, B.J., Slater, G.P., Gillott, C. & Underhill, E.W.** (1990). Attraction of the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) to volatiles of oriental mustard: The influence of age, sex, and prior exposure to mates and host plants. *Environ. Entomol.* **19**: 704-709.
- Potting, R.P.J., Vet, L.E.M. & Dicke, M.** (1995). Host microhabitat location by stem-borer parasitoid *Cotesia flavipes*: The role of herbivore volatiles and locally and systemically induced plant volatiles. *J. Chem. Ecol.* **21**: 525-539.
- Price, N.R.** (1985). The mode of action of fumigants. *J. Stored Prod. Res.* **21**: 157-164.
- Price, N.R.** (1991). Enzymatic factors in the resistance of stored-product pests to insecticides. *Biochem. Soc. Trans.* **19**: 759-762.
- Rahn, R.** (1966). La teigne du poireau *Acrolepia assectella* Zeller, éléments de biologie et mise au point d'avertissements agricoles fondés sur le piégeage sexuel des mâles. *Acad. Agric. Fr.* 997-1001.
- Rahn, R.** (1968). Rôle de la plante-hôte sur l'attractivité sexuelle de la teigne du poireau, *Acrolepia assectella* Zeller (Lep. Plutellidae). *C.R. Acad. Sc. Paris (D)* **266**: 2004-2006.
- Rahn, R.** (1971). Influence de la plante-hôte sur l'activité sexuelle de la teigne du poireau, *Acrolepia assectella* (Lepidoptera Plutellidae). *Proc. 13th Int. Cong. Entomol.*, Moscow, **1**: 547-548.
- Ratzka, A., Vogel, H., Kliebenstein, D.J., Mitchell-Olds, T. & Kroymann, J.** (2002). Disarming the mustard oil bomb. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 11223-11228.
- Rausher, M.D.** (1981). Host plant selection by *Battus philenor* butterflies: The roles of predation, nutrition, and plant chemistry. *Ecol. Monogr.* **51**: 1-20.
- Rausher, M.D.** (1992) Natural selection and the evolution of plant-insect interactions. In: *Insect Chemical Ecology*, eds, B.D. Roitberg & M.B. Isman, Chapman & Hall, New York, pp. 20-88.

- Rausher, M.D.** (1996). Genetic analysis of coevolution between plants and their natural enemies. *Trends Genet.* **12**: 212-217.
- Rausher, M.D.** (2001). Co-evolution and plant resistance to natural enemies. *Nature* **411**: 857-864.
- Raymond, M., Heckel, D.G. & Scott, J.G.** (1989). Interactions between pesticide genes: model and experiment. *Genetics* **123**: 543-551.
- Renwick, J.A.A. & Lopez, K.** (1999). Experience-based food consumption by larvae of *Pieris rapae*: addiction to glucosinolate? *Entomol. Exp. Appl.* **91**: 51-58.
- Renwick, J.A.A., Radke, C.D., Sachdev-Gupta, K. & Städler, E.** (1992). Leaf surface chemicals stimulating oviposition by *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) on cabbage. *Chemoecology* **3**: 33-38.
- Rhoades, D.F.** (1979). Evolution of plant chemical defenses against herbivores. In: *Herbivores: Their interaction with secondary plant metabolites*, eds, G. Rosenthal & M. Berenbaum, Academic Press, New York, pp. 4-54.
- Rhoades, D.F.** (1983). Herbivores population dynamics and plant chemistry. In: *Variable Plants and Herbivores in Natural and Managed Systems*, eds, R.F. Denno & M.C. McClure, Academic Press, London, pp. 155-220.
- Rodriguez-Saona, C., Crafts-Brandner, S.J., Paré, W.P. & Henneberry, T.J.** (2001). Exogenous methyl jasmonate induces volatile emissions in cotton plants. *J. Chem. Ecol.* **27**: 679-695.
- Rojas-Rousse, D.** (1980). Examen de quelques problèmes posés à propos des fluctuations du taux sexuel chez un hyménoptère entomophage *Diadromus pulchellus* (Ichneumonidae). Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Tours, 214 pages.
- Rosenthal, G. & Berenbaum, M.R.** (1991). Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites, eds, G. Rosenthal & M. Berenbaum, Academic Press, Vol. 1, New York.
- Royo, J., Leon, J., Vancanneyt, G., Albar, J.P., Rosahl, S. & Ortego, F.** (1999). Antisense-mediated depletion of a potato lipoxygenase reduces wound induction of proteinase inhibitors and increases weight gain of insect pests. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 1146-1151.
- Sabelis, M.W. & Bruin, J.** (2002). Evolution of herbivore-induced plant volatiles. *Oikos* **97**: 134-138.
- Sanon, A., Ouédraogo, A.P., Tricault, Y., Credland, P. F. & Huignard, J.** (1998). Biological control of Bruchids in cowpea stores by release of *Dinarmus basalis* (Hymenoptera: Pteromalidae) adults. *Environ. Entomol.* **27**: 717-725.
- Sato, Y., Yano, S., Takabayashi, J. & Ohsaki, N.** (1999). *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) females avoid oviposition on *Rorippa indica* plants infested by conspecific larvae. *Appl. Entomol. Zool.* **34**: 333-337.

- Schaffner, U., Boevé, J.-L., Gfeller, H. & Schlunegger, U.P.** (1994). Sequestration of *Veratrum* alkaloids by specialist *Rhadinoceraea nodicornis* Konow (Hymenoptera: Tenthrenidae) and its ecoethological implications. *J. Chem. Ecol.* **20**: 3233-3250.
- Schmelz, E.A., Alborn, H.T. & Tumlinson, J.H.** (2001). The influence of intact-plant and excised-leaf bioassay designs on volicitin- and jasmonic acid-induced sesquiterpene volatile release in *Zea mays*. *Planta* **214**: 171-179.
- Schmelz, E.A., Alborn, H.T. & Tumlinson, J.H.** (2003). Synergistic interactions between, volicitin, jasmonic acid and ethylene mediate insect-induced volatile emission in *Zea mays*. *Physiol. Plant.* **117**: 403-412.
- Schonle, I. & Bergelson, J.** (2000). Evolutionary ecology of the tropane alkaloids of *Datura stramonium* L. (Solanaceae). *Evolution* **54**: 778-788.
- Schuler, F. & Casida, J.E.** (2001). The insecticide target in the PSST subunit of complex I. *Pest. Manag. Sci.* **57**: 932-940.
- Schultz, J.C.** (2002). How plants fight dirty. *Nature* **416**: 267.
- Siegler, D.S.** (1977). Primary roles for secondary compounds. *Bioch. Syst. Ecol.* **5**: 195-199.
- Siemens, D.H. & Mitchell-Olds, T.** (1998). Evolution of pest-induced defenses in *Brassica* plants: Tests of theory. *Ecology* **79**: 632-646.
- Sime, K.R.** (2002). Chemical defence of *Battus philenor* larvae against attack by the parasitoid *Trogus pennator*. *Ecol. Entomol.* **27**: 337-345.
- Sime, K.R., Feeny, P.P. & Haribal, M.M.** (2000) Sequestration of aristolochic acids by the pipevine swallowtail butterfly, *Battus philenor* (L.): evidence and ecological implications. *Chemoecology* **10**: 169-178.
- Sinakevitch, I.G., Geffard, M., Pelhate, M. & Lapied, B.** (1996). Anatomy and targets of dorsal unpaired median neurones in the terminal abdominal ganglion of the male cockroach *Periplaneta americana* L. *J. Comp. Neurol.* **367**: 147-163.
- Slansky, F. & Feeny, P.** (1977). Stabilization of rate of nitrogen accumulation by larvae of cabbage butterfly on wild and cultivated food plants. *Ecol. Monogr.* **47**: 209-228.
- Snyder, M.J. & Glendinning, J.I.** (1996). Causal connection between detoxification enzyme activity and consumption of a toxic compound. *J. Comp. Physiol.* **179**: 255-261.
- Snyder, M.J., Stevens, J.L., Andersen, J.F. & Feyereisen, R.** (1995). Expression of cytochrome P450 genes of the CYP4 family in the midgut and fat body of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Arch. Biochem. Biophys.* **321**: 13-20.

- Srinivas, P., Danielson, S.D., Michael Smith, C. & Foster, J.E.** (2001). Induced resistance to bean leaf beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) in soybean. *J. Entomol. Sci.* **36**: 438-444.
- Städler, E., Renwick, J.J.A., Radke, C.D. & Sachdev-Gupta, K.** (1995). Tarsal contact chemoreceptor responses to glucosinolates and cardenolides mediating oviposition in *Pieris rapae*. *Physiol. Entomol.* **20**: 175-187.
- Staskawicz, B.J., Ausubel, F.M., Baker, B.J., Ellis, J.G. & Jones, J.D.G.** (1995). Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* **268**: 661-667.
- Steidle, J.L.M., Lanka, J., Müller, C. & Ruther, J.** (2001) The use of general foraging kairomones in a generalist parasitoid. *Oikos* **95**: 78-86
- Stout, M.J. & Bostock, R.M.** (1999). Specificity of induced responses to arthropods and pathogens. In: *Induced plant defense against pathogens and herbivores, biochemistry, ecology and agriculture*, eds, A.A. Agrawal, S. Tuzun, & E. Bent, the American Phytopathologist Society, St Paul, pp. 183-209.
- Stout, M.J., Workman, J. & Duffey, S.S.** (1994). Differential induction of tomato foliar proteins by arthropod herbivores. *J. Chem. Ecol.* **20**: 2575-2594.
- Stout, M.J., Workman, K.V., Bostock, R.M. & Duffey, S.S.** (1998). Specificity of induced resistance in the tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Oecologia* **113**: 74-81.
- Strauss, S.Y. & Agrawal, A.A.** (1999). The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. *TREE* **14**: 179-185.
- Strong, D.R., Lawton, J.H. & Southwood, T.R.E.** (1984). Insects on plants. Harvard Univ. Press, Cambridge.
- Swain, T.** (1977). Secondary compounds as protective agents. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* **28**: 479-501.
- Tada, M., Hiroe, Y., Kiyohara, S. & Suzuki, S.** (1988). Nematicidal and antimicrobial constituents from *Allium grayi* Regel and *Allium fistulosum* L. var. *caespitosum*. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 2383-2385.
- Takabayashi, J. & Dicke, M.** (1996). Plant-carnivore mutualism through herbivore-induced carnivore attractants. *Trends Plant. Sci.* **1**: 109-113.
- Takabayashi, J., Takahashi, S., Dicke, M. & Posthumus, M.A.** (1995). Developmental stage of herbivore *Pseudaletia separata* affects production of herbivore-induced synomone by corn plants. *J. Chem. Ecol.* **21**: 273-287.
- Tallamy, D.W.** (1986). Behaviorals adaptations in insects to plant allelochemicals. In: *Molecular Aspects of Insect-Plant Associations*, eds, L.B. Brattsten & S. Ahmad. Plenum Press, New York, pp. 273-300.
- Taylor, R.W.** (1996). Commodity fumigation beyond the year 2000. *Pestic. Outlook*, August: 31-34.

- Thaler, J.S.** (1999). Jasmonate-inducible plant defences cause increased parasitism in herbivores. *Nature* **399**: 686-688.
- Thaler, J.S., Stout, M.J., Karban, R. & Duffey, S.S.** (1996). Exogenous jasmonates stimulate insect wounding in tomato plants, *Lycopersicon esculentum*, in the laboratory and field. *J. Chem. Ecol.* **22**: 1767-1781.
- Thaler, J.S., Stout, M.J., Karban, R. & Duffey, S.S.** (2001). Jasmonate-mediated induced plant resistance affects a community of herbivores. *Ecol. Entomol.* **26**: 312-324.
- Thibout, E.** (1974). Influences respectives de la plante-hôte et de la copulation sur la longévité, la ponte, la production ovarienne et la fertilité des femelles d'*Acrolepiopsis assectella* Zell. (Lepidoptera : Plutellidae). *Ann. Zool. Ecol. Anim.* **6**: 81-96.
- Thibout, E.** (1978). L'activité sexuelle et le rôle de l'accouplement sur la reproduction d'un lépidoptère à distribution géographique étendue : *Acrolepiopsis assectella* Zell. (Hyponeumotoidea). Thèse doctorat d'état, Tours, 158 pp.
- Thibout, E.** (1988). La spécificité de *Diadromus pulchellus* (Hyménoptère : Ichneumonidae) vis-à-vis de son hôte *Acrolepiopsis assectella*, la teigne du poireau. *Entomophaga* **33**: 439-452.
- Thibout, E. & Auger, J.** (1996). Behavioural events and host constituents involved in oviposition in the leek moth *Acrolepiopsis assectella*. *Entomol. Exp. Appl.* **80**: 101-104.
- Thibout, E. & Auger, J.** (1997). Composés soufrés des *Allium* et lutte contre les insectes. *Acta Bot. Gallica* **144**: 419-426.
- Thibout, E., Auger, J. & Lecomte, C.** (1982). Host plants chemicals responsible for attraction and oviposition in *Acrolepiopsis assectella*. In: *Proc. 5th Int. Symp. Insect-Plant Relationships*, eds, J.H. Visser & A.K. Minks, Pudoc, Wageningen, pp. 107-115.
- Thibout, E., Guillot, J.F. & Auger, J.** (1993). Microorganisms are involved in the production of volatile kairomones affecting the host seeking behaviour of *Diadromus pulchellus*, a parasitoid of *Acrolepiopsis assectella*. *Physiol. Entomol.* **18**: 176-182.
- Thibout, E., Lecomte, C. & Auger, J.** (1996). Substances soufrées des *Allium* et insectes. *Acta Bot. Gallica* **143**: 137-142.
- Thibout, E., Guillot, J.F., Ferary, S., Limouzin, P. & Auger, J.** (1995). Origin and identification of bacteria which produce kairomones in the frass of *Acrolepiopsis assectella* (Lep., Hyponomeutoidea). *Experientia* **51**: 1073-1075.

- Towers, P.R. & Satelle, D.B.** (2002). A *Drosophila melanogaster* cell line (S2) facilitates post-genome functional analysis of receptors and ion channels. *BioEssays* **24**: 1066-1073.
- Trounce, I.A., Kim, Y.L., Jun, A.S. & Wallace, D.C.** (1996). Assessment of mitochondrial oxidative phosphorylation in patient muscle biopsies, lymphoblasts, and transmittochondrial cell lines. *Methods Enzymol.* **264**: 484-509.
- Tumlinson, J.H., Lewis, W.J. & Vet, L.E.M.** (1993). How parasitic wasp find their hosts. *Scientific American March*: 100-106.
- Tumlinson, J.H., Paré, P.W. & Lewis, W.J.** (1999). Plant production of volatile semiochemicals in response to insect-derived elicitors. In: *Insect-plant interactions and induced plant defence*, eds, D.J. Chadwick & J. Goode, Wiley, Chicester (Novartis Foundation symposium 223), pp. 95-105.
- Turlings, T.C.J. & Tumlinson, J.H.** (1992). Systemic release of chemicals signals by herbivore-injured corn. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 8399-8402.
- Turlings, T.C.J., Tumlinson, J.H. & Lewis, W.J.** (1990). Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science* **250**: 1251-1253.
- Turlings, T.C.J., McCall, P.J., Alborn, H.T. & Tumlinson, J.H.** (1993). An elicitor in caterpillar oral secretions that induces corn seedlings to emit chemical signals attractive to parasitic wasps. *J. Chem. Ecol.* **19**: 411-425.
- Turlings, T.C.J., Loughrin, J.H., McCall, P.J., Röse, U.S.R., Lewis, W.J. & Tumlinson, J.H.** (1995). How caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parastic wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 4169-4174.
- Underwood, N.C.** (1998). The timing of induced resistance and induced susceptibility in the soybean-Mexican bean beetle system. *Oecologia* **114**: 376-381.
- van Dam, N.M., Hadwich, K. & Baldwin, I.T.** (2000). Induced responses in *Nicotiana attenuata* affect behavior and growth of the specialist herbivore *Manduca sexta*. *Oecologia* **122**: 371-379.
- van der Meijden, E.** (1996). Plant defence, an evolutionary dilemma: contrasting of (specialist and generalist) herbivores and natural enemies. *Entomol. Exp. Appl.* **80**: 307-310.
- van der Meijden, E., & Klinkhamer, P.G.L.** (2000). Conflicting interests of plant and the narural enemies of herbivores. *Oikos* **89**: 202-208.
- van Driesche, R.G. & Bellows, T.S.** (1996). Biological control. Chapman & Hall, New York. 539 pp.
- van Loon, J. J. A., de Boer, J.G. & Dicke, M.** (2000). Parasitoid-plant mutualism: parasitoid attack of herbivore increases plant reproduction. *Entomol. Exp. Appl.* **97**: 219-227.

- van Loon, J. J. A., Blaakmeer, A., Griepink, F.C., van Beek, T.A., Schoonhoven, L.M. & de Groot, A.** (1992). Leaf surface compound from *Brassica oleracea* (Cruciferae) induces oviposition by *Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pieridae). *Chemoecology* **3**: 39-44.
- van Poecke, R.M.P. & Dicke, M.** (2001). Induced parasitoid attraction by *Arabidopsis thaliana*: involvement of the octadecanoid and the salicylic acid pathway. *J. Exp. Bot.* **53**: 1793-1799.
- Vanlerberghe, G.C. & McIntosh, L.** (1997). Alternative oxidase: from gene to function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 703-734.
- Vet, L.E.M. & Dicke, M.** (1992). Ecology of infochemicals use by natural enemies in a tritrophic context. *Annu. Rev. Entomol.* **37**: 141-172.
- Verkerk, R.H.J. & Wright, D.J.** (1996). Multitrophic interactions and management of the diamondback moth: a review. *Bull. Entomol. Res.* **86**: 205-216.
- Virtanen, A.I.** (1965). Studies on organic sulphur compounds and other labile substances in plants. *Phytochem.* **4**: 207-228.
- Virtanen, A.I. & Späre, C.G.** (1963). Isolation of the precursor of the lacrymatory factor in onion (*Allium cepa*). *Suomen. Kem.* **34**: 72-80.
- Voelckel, C., Krügel, T., Gase, K., Heidrich, N., van Dam, N.M., Winz, R., Baldwin, I.T.** (2001). Anti-sense expression of putrescine N-methyltransferase confirms defensive role of nicotine in *Nicotiana sylvestris* against *Manduca sexta*. *Chemoecology* **11**: 121-126.
- Wadleigh, R.W. & Yu, S.J.** (1988). Metabolism of an organothiocyanate allelochemical by glutathione transferase in three lepidopterous insects. *J. Econ. Entomol.* **81**: 776-780.
- Wallbank, B.E. & Wheatley, G.A.** (1979). Some responses of cabbage root fly (*Delia brassicae*) to allyl isothiocyanate and other volatile constituents of crucifers. *Ann. Appl. Biol.* **9**: 1-12.
- Watson, R.T.** (1992). Methyl bromide. Science and technology and economic synthesis report. *Fumigant and Pheromone* **29**: 11-24.
- Weber, H., Vick, B.A. & Farmer, E.E.** (1997). Dinor-oxo-phytodienoic acid: a new hexadecanoid signal in the jasmonate family. *Plant Biol.* **94**: 473-478.
- Wei, S.H., Clark, A.G. & Syvanen, M.** (2001). Identification and cloning of key insecticide-metabolizing glutathione S-transferase (Md GST-6A) from a hyper insecticide-resistant strain of the housefly *Musca domestica*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **31**: 1145-1153.
- Weinzerl, R.** (1998). Botanicals insecticide, soaps and oils. In: *Biological, Biotechnological control of insect pest*, eds, J.E. Rechcigl & N.A. Rechcigl. Boca Raton, Florida, pp. 101-121.

- Wicher, D., Walther, C.H. & Wicher, C.** (2001). Non-synaptic ion channels in insects – basic properties of currents and their modulation in neurons and skeletal muscles. *Prog. Neurobiol.* **64**: 431-525.
- Yu, S.J.** (1982). Host plant induction of glutathione S-transferase in the fall armyworm. *Pestic. Biochem. Physiol.* **18**: 101-106.
- Yu, S.J.** (1987). Detoxification of isothiocyanate allelochemicals by glutathione transferase in three lepidopterous species. *J. Chem. Ecol.* **14**: 1279-1288.
- Zangerl, A.R. & Bazzaz, F.A.** (1992). Theory and pattern in plant defense allocation. In: *Plant resistance to herbivore and pathogens: Ecology, evolution, and genetics*, eds, R.S. Fritz & E.L. Simms, University of Chicago Press, Chicago, pp. 363-391.
- Zettler, J.L.** (1991). Pesticide resistance in *Tribolium castaneum* and *T. confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae) from flour mills in the United States. *J. Econ. Entomol.* **83**: 1677-1681.
- Zettler, J.L., Halliday, W.R. & Arthur, F.H.** (1989). Phosphine resistance in insects infecting stored peanuts in the southeastern United States. *J. Econ. Entomol.* **82**: 1508-1511.
- Zlotkin, E.** (1999) The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides. *Annu. Rev. Entomol.* **44**: 429-455.

ANNEXE

PUBLICATIONS & COMMUNICATIONS

Revues internationales

1. **S. Dugravot**, A. Sanon, E. Thibout and J. Huignard (2002) Susceptibility of *Callosobruchus maculatus* and its parasitoid *Dinarmus basalis* to two sulphur containing compounds. Consequences on Biological Control. *Environmental Entomology* 31: 550-557.
2. **S. Dugravot**, F. Grolleau, D. Macherel, A. Rochetaing, B. Hue, M. Stankiewicz, J. Huignard and B. Lapied (2003) Dimethyl disulfide exerts insecticidal neurotoxicity through mitochondrial dysfunction and activation of insect K_{ATP} channels. *Journal of Neurophysiology* 90: 259-270.
3. **S. Dugravot**, E. Thibout, A. Abo-Ghalia and J. Huignard (2004) How specialist and nonspecialist insects cope with sulfur allelochemicals produced by plants. *Entomologia Experimentalis & Applicata* 113: 173-179.
4. **S. Dugravot**, N. Mondy, N. Mandon and E. Thibout (2005) Increased sulfur precursors and volatiles production by the leek *Allium porrum* in response to specialist insect attack. *Journal of Chemical Ecology* 31: 1299-1314.
5. **S. Dugravot** and E. Thibout (2006) Consequence for a specialist insect and its parasitoid of the response of *Allium porrum* to conspecific herbivore attack. *Physiological Entomology* 31: 73-79.

Chapitres d'ouvrage et publications de rang B

6. J. Auger, **S. Dugravot**, A. Naudin, A. Abo-Ghalia, D. Pierre and E. Thibout (2002) Utilisation des composés allélochimiques des *Allium* en tant qu'insecticides. In : *Use of pheromones and other semiochemicals in integrated control. IOBC Wprs Bulletin Vol 25* (9).
7. J. Huignard, **S. Dugravot**, K.G. Ketoh, E. Thibout and A.I. Glitho (2002) Utilisation de composés secondaires des végétaux pour la protection des graines d'une légumineuse, le niébé. Conséquences sur les insectes ravageurs et leurs parasitoïdes. In : *Biopesticides d'origine végétale*. Regnault-Roger C., Philogène B., Vincent C. Eds., Lavoisier, Paris, 133-149.
- 7.bis J. Huignard, **S. Dugravot**, K.G. Ketoh, E. Thibout and A.I. Glitho (2004) Utilizacion de los compuestos secundarios de los vegetales para la proteccion de los granos de una leguminosa : el caupi. Consecuencias sobre los insectos depredadores y sus parasitoides. In : *Biopesticidas de origen vegetal*. Regnault-Roger C., Philogène B., Vincent C. Eds., Mundi-Prensa, Madrid, 135-152.
- 7.ter J. Huignard, **S. Dugravot**, K.G. Ketoh, E. Thibout and A.I. Glitho (2005) Use of secondary plant products to protect the seeds of a legume, cowpea : Effects on insect pests and their parasitoids. In: *Biopesticides of plant origin*. Regnault-Roger C., Philogène B., Vincent C. Eds., Lavoisier, Paris, 123-137.

Communications

1. **S. Dugravot**, N. Mondy, B. Lapied, J. Auger, J. Huignard, D. Pierre, and E. Thibout. Interactions between *Allium* allelochemicals and insect species. The 11th International Symposium on Insect-Plant Relationships. Helsingor, Danemark (2001).

2. **S. Dugravot**, N. Mondy, D. Pierre and E. Thibout. Defence strategies developed by the leek to minimize insect damage. 3^{ème} Cycle Roman en Sciences Biologiques: « Exploitation of plant defence chemistry by insect ». Neuchâtel, Suisse (2001).
3. **S. Dugravot**, F. Grolleau, D. Macherel, A. Rochetaing, J. Huignard and B. Lapied. Insecticidal neurotoxicity of plant natural sulfur through mitochondrial dysfunction reveals the implication of ATP-sensitive potassium channels in the pacemaker activity of insect neurosecretory cells. 3rd Forum of European Neuroscience. Paris, France (2002).
4. **S. Dugravot**, N. Mondy, N. Mandon, D. Pierre, J-C. Biémont, J. Auger and E. Thibout. Induced response of the leek to attacks of the leek moth. Consequences on host foraging behaviour of the parasitoid, *Diadromus pulchellus*. 8th European Workshop on Insect Parasitoid. Tours, France (2002).
5. **S. Dugravot**, N. Mondy, D. Pierre et E. Thibout. Réponse du poireau aux attaques des herbivores et conséquences sur les insectes satellites. 1^{ères} Journées Françaises du Réseau des Interactions Arthropodes-Plantes. Versailles, France (2003).
6. **S. Dugravot**, M. Magnin-Robert, N. Mondy, D. Macherel, J. Huignard, J. Auger, B. Lapied. Toxicité et mode d'action des substances allélochimiques des *Allium* vis à vis des insectes urbains et des denrées stockées. 14^{èmes} Colloque de Physiologie de l'Insecte. Amiens, France (2003).
7. **S. Dugravot**, N. Mondy, and E. Thibout. Induced responses in the leek by insect attacks: Possible implications in defence processes. The 12th International Symposium on Insect-Plant Relationships. Berlin, Germany (2004).